

CHARAKTERISIERUNG EINES
DNA-ELEMENTS
ZUR ANAEROBEN EXPRESSION EINES
GÄRUNGSENZYMS
IN ESCHERICHIA COLI

DISSERTATION
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORGELEGT VON
ANGELIKA BIRKMANN
AUS MÜNCHEN

APRIL 1989



CHARAKTERISIERUNG EINES
DNA-ELEMENTS
ZUR ANAEROBEN EXPRESSION EINES
GÄRUNGSENZYMS
IN ESCHERICHIA COLI

DISSERTATION
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORGELEGT VON
ANGELIKA BIRKMANN
AUS MÜNCHEN

APRIL 1989

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck
2. Gutachter: Prof. Dr. H.-U. Koop

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juni 1989

Abkürzungen für Antibiotika:

Ap	Ampicillin	r : resistant
Cm	Chloramphenicol	
Km	Kanamycin	
Rif	Rifampicin	
Sm	Streptomycin	
Spk	Spektinomycin	
Tet	Tetrazyklin	

Abkürzungen für Restriktionsenzyme:

A	Asp718	K	KpnI
Aa	AatII	M	MluI
Ac	AccI	N	NsiI
B	BamHI	Nh	NheI
Bg	BglII	Nr	NruI
Bl	BglI	P	PstI
C	ClaI	R	RsaI
E	EcoRI	S	SalI
EV	EcoRV	Sm	SmaI
H	HindIII	X	XhoII
Hc	HincII	Xb	XbaI

Abkürzungen:

AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CGSC	E. coli Genetic Stock Center
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
h	Stunden
IPTG	Isopropylthio- β -D-Galaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
min	Minuten
NG	Nitrosoguanidin
OD_{λ}	"optische Dichte" bei der angegebenen Wellenlänge λ
ORF	offener Leserahmen
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
T4	Bakteriophage T4
T7	Bakteriophage T7
Tn	Transposon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UAS	upstream activator sequence
URS	upstream regulatory sequence
Wt	Wildtyp

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	12
I. Verwendete Bakterienstämme und Bakteriophagen	12
II. Plasmidvektoren und rekombinante Plasmide	13
III. Nährmedien	16
IV. Standardpuffer	20
V. Anzuchten der Bakterien	20
VI. Genetische Methoden	21
1. Transduktionen	21
2. Kurieren von Transposon Tn10	21
3. Test genetischer Marker	21
VII. Molekulargenetische Methoden	21
1. Isolierung von Plasmid DNA	21
a) Schnellpräparation	21
b) Präparation im großen Maßstab	22
2. Isolierung von RNA	22
3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	22
4. Isolierung von Oligonukleotiden aus Polyacryl- amidgelen	23
5. Klonierungen	23
a) Enzymatische in vitro Reaktionen an DNA	23
b) Transformation	25
6. In vitro ³² P-Markierung von DNA	25
7. Hybridisierungstechniken	25
a) Transfer von Nukleinsäuren	25
b) Hybridisierung mit "Northern Blots"	25
c) DNA Dot Blot und Hybridisierung mit markierten Oligonukleotiden	26
8. Nuklease S1 Kartierung des Transkriptionsstarts	26
9. DNA-Sequenzierung	27
a) Chemische Methode	27
b) Enzymatische Methode	27
10. Plasmidmutagenese mit Nitrosoguanidin	27

VIII. Elektrophorese-Techniken	28
1. Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	28
2. Trennung von DNA-Fragmenten in nativen Polyacrylamidgelen	28
3. Sequenzgele	28
4. Reinigung von Oligonukleotiden in Polyacrylamidgelen	28
5. Formaldehydgele zur Trennung von RNA	28
6. SDS Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen	28
IX. Expression im T7 RNA Polymerase/Promotor System	29
X. Enzymaktivitätstests	29
1. β -Galaktosidase	29
2. Glutaminsynthetase	29
3. β -Laktamase	30
XI. Proteinbestimmung	30
XII. Liste besonderer Chemikalien und Bezugsquellen	30

ERGEBNISSE

I. Konstruktion und Analyse einer fdhF'-lacZ Genfusion	31
1. Klonierungsstrategie	31
2. Regulation der β -Galaktosidase Expression	33
3. Gendosiseffekt	34
4. Zeitlicher Verlauf der Enzyminduktion	35
II. Einfluß von Selen auf die Expression von fdhF'-lacZ Genfusionen	37
1. Anzuchten unter Selenmangel	37
2. Expression der fdhF'-lacZ Fusionen in Abhängigkeit von Selen	38
3. Einfluß von Selen auf die Transkription von fdhF'-lacZ	41
III. Nuklease-Bal31 Verkürzung der fdhF Promotorregion	43
1. Nuklease Bal31 Verkürzung	43
2. Charakterisierung einzelner Deletionsklone	45
3. β -Galaktosidase Aktivität der Deletionsmutanten	47
IV. Einfluß verschiedener Mutationen auf die Expression von fdhF'-lacZ	49

1. Analyse von fnr Mutanten	49
2. Analyse einer FDH_N Mutante	52
V. Konstruktion und Analyse einer fdhF'-Tet Operonfusion	54
VI. Analyse des fdhF Promotors	56
1. Nuklease S1 Kartierung des Transkriptionsstarts	56
2. Einfluß von Mutationen im -12 Konsensus Motiv des fdhF Promotors auf die Expression von fdhF'-lacZ	59
3. Einfluß einer ntrA-Mutation auf die Expression von fdhF'-lacZ	62
VII. Klonierung und Expression des ntrA-Gens aus Escherichia coli	68
1. Klonierung des ntrA-Gens aus Escherichia coli	68
2. Expressionsanalyse des plasmidkodierten ntrA-Gens	69
3. Komplementationsanalyse	74
4. Einfluß einer erhöhten ntrA-Genkopienzahl auf die Expression von fdhF'-lacZ	75
VIII. Isolierung von Mutanten mit veränderter fdhF'-lacZ Expression	77
1. Plasmidmutagenese	77
2. Lokalisierung der Punktmutationen in einzelnen Mutanten	79
3. Analyse der Mutante pBN314	82
IX. Einfluß von Metallionen auf die Aktivierung von fdhF'-lacZ	84
1. Effekt von Dipyridyl auf die Expression von fdhF'-lacZ	84
2. Expression von fdhF'-lacZ in einer fur Mutante	86
X. Analyse des cis-regulatorischen DNA-Elements in der fdhF Kontrollregion	88
1. Nuklease Bal31 Verkürzung des URS-Elements	88
2. β -Galaktosidase Aktivität der 5' Deletionsmutanten	90
3. Einfluß von Abstand und Orientierung des URS-Elements auf die Aktivierung des fdhF-Promotors	92
4. Konstruktion und Analyse von Mutanten mit Veränderungen im URS-Element	99

5. Aktivierung von fdhF'-lacZ mit verkürzten URS-Elementen	101
XI. Konstruktion und Analyse eines Promotorhybrids zwischen dem tac-Promotor und der fdhF Promotorregion	104
XII. Konstruktion und Analyse einer nifH _B ~ fdhF'-lacZ Hybridfusion mit dem URS-Element von nifH _B und dem fdhF-Promotor	106
1. Konstruktion von nifH _B ~ fdhF'-lacZ Hybridfusionen	106
2. β -Galaktosidase Aktivität der nifH _B ~ fdhF'-lacZ Hybride	106
XIII. NIFA- und NTRC-abhängige Aktivierung von fdhF'-lacZ	110
1. NIFA-abhängige Aktivierung von fdhF'-lacZ	110
2. NTRC-abhängige Aktivierung von fdhF'-lacZ	112
XIV. Konstruktion und Analyse von chimären fdhF (URS) ~ nif'-lacZ Fusionen mit dem URS-Element von fdhF und verschiedenen nif-Promotoren	116
1. Klonierungsstrategie	116
2. β -Galaktosidase Aktivität der fdhF(URS) ~ nif'-lacZ Hybride	118
DISKUSSION	122
ZUSAMMENFASSUNG	135
LITERATURVERZEICHNIS	137

E I N L E I T U N G

Fakultativ anaerobe Organismen, wie zum Beispiel *Escherichia coli*, besitzen die Fähigkeit zu Energiegewinnung, Wachstum und Vermehrung in aerober wie in anaerober Umgebung. In Anwesenheit von Sauerstoff werden angebotene Nährstoffe mit Hilfe einer Atmungskette endoxidiert. Unter anaeroben Bedingungen besitzen solche Organismen dagegen mehrere Möglichkeiten der Energiegewinnung. Zum einen können Zucker vergoren werden, zum anderen können Nährstoffe in Anwesenheit externer Elektronenakzeptoren, wie zum Beispiel Nitrat oder Fumarat, auch anaerob veratmet werden. Daher sind fakultative Anaerobier in ihren Stoffwechselleistungen optimal an unterschiedliche Umweltgegebenheiten angepaßt.

Obwohl die dafür in der Zelle notwendigen Regulations- und Steuervorgänge bereits seit nunmehr über 30 Jahren untersucht werden, sind die Mechanismen, die eine aerobe beziehungsweise anaerobe Induktion oder Aktivierung von Enzymen ermöglichen, noch weitgehend unbekannt.

Anaerob induzierbare Proteine in verschiedenen Organismen

Die exakte Zahl der in *Escherichia coli* durch Anaerobiose induzierbaren Proteine ist nicht bekannt. In den letzten Jahren wurde von einigen Arbeitsgruppen versucht, diese Zahl aufgrund von Daten aus verschiedenen Experimenten abzuschätzen. So wurden von Smith und Neidhardt 18 Proteine identifiziert, die unter anaeroben Bedingungen stark exprimiert werden (178). Andere Untersuchungen deuten aber darauf hin, daß durch Anaerobiose die Synthese von wesentlich mehr Proteinen in *E. coli* ausgelöst wird (43, 166).

Unterschiedliche Genexpression, je nach An- oder Abwesenheit von Sauerstoff, wurde ebenso in *Salmonella typhimurium* nachgewiesen (2, 189).

Unter den Prokaryonten, die die Fähigkeit zu anaerober Regulation besitzen, müssen weiterhin die photosynthetischen Bakterien genannt werden. In den zu dieser Gruppe zählenden fakultativen, schwefelfreien Purpurbakterien wird die Bakteriochlorophyllbiosynthese und die Synthese der Proteine für photosynthetische Reaktionszentren (puf-Operon) anaerob induziert (18, 45).

Das strikt aerobe Bakterium *Alcaligenes eutrophus* hat einen rein respiratorischen Stoffwechsel. Trotzdem können nach Inkubation unter sauerstofflimitierenden Bedingungen typische Gärungsprodukte, wie beispielsweise Laktat, 2,3-Butandiol und Äthanol im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Die entsprechenden Gärungsenzyme werden nur unter anaeroben Bedingungen induziert und sind in den Zellen nach aerober Anzucht nicht vorhanden (167). Ein Nachweis von Gärungsenzymen gelang auch in anderen Arten der strikt aeroben Gattung *Alcaligenes*, ebenso in Spezies der Gattungen *Nocardia* und *Xanthobacter* (184).

Als weiteres wichtiges Beispiel für anaerobe Induktion von Enzymsystemen darf in diesem Zusammenhang auch die Regulation der Nitrogenase-Synthese, beispielsweise in *Klebsiella pneumoniae*, nicht übersehen werden (35).

Die fakultativ anaerobe Hefe, *Saccharomyces cerevisiae*, besitzt ebenfalls die Fähigkeit zu anaerober Regulation der Genexpression. Eindeutig nachgewiesen werden konnte bislang die Induktion des Gens HEM13 (Coproporphyrinogen Oxidase) durch Anaerobiose (206).

Maiskeimlinge reagieren auf Anaerobiose (Überfluten des Bodens) mit Veränderungen im Proteinmuster der Primärwurzelzellen. Das bedeutet im einzelnen, daß einige aerob exprimierte Proteine nicht mehr synthetisiert werden, und daß ungefähr 20 Proteine anaerob induziert werden (160). Unter diesen Proteinen sind wiederum typische Gärungsenzyme, wie zum Beispiel Alkoholdehydrogenase und Fruktose-1,6-diphosphataldolase (99, 159).

Modelle zum Mechanismus der anaeroben Regulation

Wie die im letzten Abschnitt aufgezählten Beispiele demonstrieren, ist die Regulation von Aktivität oder Synthese bestimmter Enzyme als Reaktion auf Aerobiose oder Anaerobiose ein nicht nur auf Bakterien beschränktes, sondern weiter verbreitetes Phänomen.

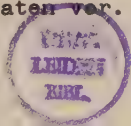
Theoretisch sind mehrere Mechanismen denkbar, die gezielte aerobe beziehungsweise anaerobe Induktion oder Aktivierung von Enzymsystemen ermöglichen können:

- a) reversible Inaktivierung von Enzymen in Anwesenheit von Sauerstoff;
- b) irreversible Inaktivierung von Enzymen durch Sauerstoff;
- c) Regulation der Transkription der entsprechenden Gene;
- d) unterschiedliche mRNA Stabilität unter aeroben und anaeroben Wachstumsbedingungen.

Nach den bisherigen Erkenntnissen sind diese verschiedenen Möglichkeiten in der Natur auch tatsächlich verwirklicht.

Zwei gut untersuchte Beispiele für die Inaktivierung anaerober Enzyme in Anwesenheit von Sauerstoff, also einer Regulation auf der Ebene der Enzymaktivität, bieten die Pyruvatformiatlyase aus *Escherichia coli* und die anaerobe, NAD-gekoppelte Glyzerindehydrogenase aus *Klebsiella pneumoniae*. Das letztere Enzym wird durch Sauerstoff oxidativ modifiziert und dadurch irreversibel inaktiviert (94). Die Pyruvatformiatlyase liefert ein Beispiel für reversible Enzyminaktivierung. Die von ihr katalysierte Reaktion, die nicht-oxidative Spaltung von Pyruvat unter anaeroben Bedingungen in Formiat und Acetat, ist in *E. coli* eingehend untersucht worden. Es stellte sich heraus, daß die Aktivität der dafür verantwortlichen Pyruvatformiatlyase durch einen komplexen, enzymatischen Aktivierungs- und Deaktivierungsmechanismus gesteuert wird (101, 102, 103).

Die Stabilität der mRNA anaerober Enzyme nach einem Übergang von anaeroben zu aeroben Wachstumsbedingungen ist bislang kaum untersucht. Nur für die mRNA der Nitrogenase aus *Klebsiella pneumoniae* liegen genauere Daten vor. Demnach werden biologische und



chemische Halbwertszeit dieser mRNA nach einem Wechsel zu nicht-permissiven Bedingungen um etwa ein Drittel reduziert (98).

Im folgenden soll die Regulation auf der Transkriptionsebene genauer betrachtet werden. Theoretisch sind hier wiederum mehrere Mechanismen denkbar, die zu anaerober Induktion einzelner Gene führen können: zum einen eine Aktivierung der Genexpression unter anaeroben Bedingungen (also eine positive Kontrolle) und zum anderen eine Repression der Transkription unter aeroben Bedingungen (also eine negative Kontrolle). Diese relativ einfache Modellvorstellung muß aber, zumindest für fakultative Anaerobier wie *E. coli*, mit Sicherheit noch erweitert werden. Vermutlich setzen hier positive und negative Regulatoren am gleichen System an. Diese Organismen besitzen neben den Gärungsenzymen ein ganzes Netzwerk an Elektronentransportsystemen, so daß immer die Enzyme des energetisch günstigsten Stoffwechselweges synthetisiert und andere Abbauewege reprimiert werden. Daher werden in *E. coli* in Anwesenheit von Sauerstoff beispielsweise Gärungsenzyme und auch die Nitratreduktase (für anaerobe Nitratatmung) nicht synthetisiert. Dieselben Gärungsenzyme können aber auch unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Nitrat nicht nachgewiesen werden, obwohl die Nitratreduktase hier jedoch stark exprimiert wird (199).

Eine zentrale Frage bei der Aufklärung der an diesem Phänomen beteiligten Kontrollsysteme betrifft die Natur des zellulären "Sensors" für "Aerobiose" beziehungsweise "Anaerobiose" und das Signal, das von diesem postulierten "Sensor" erkannt werden kann. In Zusammenhang mit dem von der Zelle registrierten Signal für "Anaerobiose" oder "Aerobiose" wurden bislang hauptsächlich folgende zwei Möglichkeiten diskutiert: zum einen das intrazelluläre Verhältnis zwischen NAD und NADH_2 und zum anderen das Redoxpotential des Kulturmediums.

Von Wimpenny und Firth konnte gezeigt werden, daß sich in verschiedenen fakultativ anaeroben Organismen nach einem Wechsel von aeroben zu anaeroben Wachstumsbedingungen der NADH-Spiegel kaum, der NAD-Spiegel dagegen erheblich ändert (200). Die daraus

resultierende Veränderung des NAD/NADH₂-Verhältnisses könnte nach dieser Theorie von der Zelle erkannt werden und als Signal für "Anaerobiose" dienen.

Alternativ wurde von Wimpenny und Cole auch das Redoxpotential des Kulturmediums als mögliches Signal für spezifische Induktion oder Repression anaerober oder aerober Reduktasen vorgeschlagen (199). Von den gleichen Autoren wurde in diesem Zusammenhang das Modell der "Redoxkontrolle" anaerob induzierter Enzyme aufgestellt. Der entscheidende, von der Zelle registrierte Faktor für die koordinierte Regulation der verschiedenen Stoffwechselwege ist nach dieser Hypothese das Redoxpotential des Kulturmediums, das sich je nach Vorhandensein externer Elektronenakzeptoren (Sauerstoff, Nitrat, Fumarat u.a.) erheblich verändert. Das intrazelluläre Redoxpotential bleibt nach Wimpenny und Firth relativ konstant und schwankt zwischen -330 mV anaerob und -300 mV aerob (200).

Abschließend läßt sich zu diesem Aspekt der Regulation also feststellen, daß bisher weder über das zelluläre Signal für "Sauerstoff" oder "Anaerobiose" noch über den potentiellen "Sensor", der die beobachteten Regulationsphänomene steuern könnte, genaue Aussagen getroffen werden können. Es ist daher auch nicht bekannt, ob für die Regulation der verschiedenen anaeroben Enzymsysteme ein "Sensor" existiert, oder ob diese Aufgabe in den einzelnen Systemen von unterschiedlichen Faktoren wahrgenommen wird.

Pleiotrope Regulationsmutanten von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*

In *E. coli* und *S. typhimurium* sind anaerob induzierbare Gene über das gesamte Chromosom verteilt (2, 201). Es ist bislang umstritten, ob alle diese Gene und Operone einem globalen Regulon angehören. Das würde nach dem Regulonkonzept im strengen Sinn erfordern, daß sie über einen gemeinsamen Effektor und ein gemeinsames Regulatorprotein kontrolliert werden müßten (118).

Nach den bisher verfügbaren Daten über verschiedene anaerob induzierbare Gene ist es allerdings, wie im folgenden noch näher erläutert werden soll, wahrscheinlicher, daß entweder mehrere verschiedene, voneinander unabhängige Regulationsmechanismen existieren, oder daß nach der Theorie von Iuchi und Lin verschiedene Regulone ein Modulon bilden, also die Kontrolle verschiedener Regulone durch ein gemeinsames Regulatorprotein moduliert wird (89).

In *E. coli* und *S. typhimurium* sind bislang mehrere pleiotrope Genorte bekannt, die eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Genexpression unter anaeroben Wachstumsbedingungen spielen: *arcA*, *fnr* (*oxrA*), (*oxrB*), (*oxrC*); (Gensymbole in Klammer: Genorte in *Salmonella typhimurium*).

Nach jetzigen Erkenntnissen ist das *arcA*-Genprodukt in *E. coli* ein Regulatorprotein, das eine Funktion bei der Repression der Enzyme für aerobe Stoffwechselwege (Tricarbonsäurezyklus, Glyoxylatzyklus, Cytochrom o Oxidase Komplex u.a.) unter anaeroben Bedingungen ausübt. Der exakte Regulationsmechanismus ist allerdings noch unbekannt (89).

Das *oxrB*-Gen wurde bisher nur in *S. typhimurium* lokalisiert und ist nicht gut untersucht. Entscheidend ist jedoch, daß in *oxrB*-Mutanten bestimmte Enzyme des anaeroben Stoffwechsels, wie zum Beispiel die Tripeptidase T (*pepT*) nicht mehr gebildet werden (189).

OxrC-Mutanten wurden ebenso nur von *S. typhimurium* isoliert. Der *oxrC*-Genort entspricht möglicherweise dem *pgi*-Gen (für Phosphoglukoseisomerase), das bisher aber nicht als Regulatorgen beschrieben worden war. Von Jamieson und Higgins konnte nachgewiesen werden, daß das *oxrC*-Genprodukt für die Expression von Formiatdehydrogenase H, Tripeptidase T und Hydrogenase 1 und 3 essentiell ist (91).

Das am besten charakterisierte Regulatorprotein des anaeroben Stoffwechsels ist das FNR-Protein aus *E. coli*. Das *fnr*-Genprodukt

ist unter anderem für die Bildung folgender Enzyme des anaeroben Stoffwechsels notwendig: Nitratreduktase (106, 185), Fumaratreduktase (104, 106), Nitritreduktase (134), Hydrogenase 1 und 2 (162), Pyruvatformiatlyase (163). Das *fnr*-Gen wurde in den letzten Jahren kloniert und sequenziert (173, 174). Eine Analyse der Nukleotidsequenz ergab den Befund, daß es in Teilen dem CRP-Protein (cAMP Rezeptorprotein) homolog ist (175). Durch Experimente mit dem gereinigten FNR-Protein konnte allerdings bislang *in vitro* keine spezifische DNA-Bindung nachgewiesen werden (195). Auch eine aus der Homologie zwischen FNR und dem CRP-Protein angenommene Bindung von cAMP an das FNR-Protein konnte experimentell nicht verifiziert werden (194). Die Verfügbarkeit der Nukleotidsequenz einiger FNR-abhängiger Gene ermöglichte es allerdings, nach einem Homologievergleich der Promotorregionen eine Konsensussequenz für eine FNR-Bindestelle zu postulieren (181). Die Theorie, daß FNR ein Transkriptionsaktivator ist, ließ sich mit Hilfe einer FNR-Mutante mit veränderter DNA-Bindedomäne erhärten. Diese von Spiro und Guest durch lokalisierte Mutagenese konstruierte *fnr*-Mutante enthält eine dem CRP-Protein ähnliche DNA-Bindedomäne und erlaubt eine anaerobe, nicht durch Katabolitrepression beeinflusste Induktion des *lac*-Operons (182). Über den Mechanismus der Transkriptionsaktivierung bestimmter Gene durch das FNR-Protein unter anaeroben Bedingungen existieren bisher nur Modellvorstellungen. Es gibt jedoch Hinweise dafür, daß das FNR-Protein möglicherweise selbst "Sauerstoff" beziehungsweise "Anaerobiose" sensieren kann (183).

Ein für Funktion und Bedeutung des FNR-Proteins für den gesamten anaeroben Stoffwechsel wichtiger Befund ist aber die Tatsache, daß nicht alle anaerob induzierbaren Gene FNR-abhängig sind. Es handelt sich bei FNR also nicht um ein globales Regulatorprotein. Bisher bekannte FNR-abhängige Gene kodieren überwiegend für Enzyme der anaeroben Atmungsketten, dagegen ist beispielsweise die Bildung von Tripeptidpermease in *S. typhimurium* (91), Trimethylamin-N-oxid-Reduktase in *E. coli* (140) und Hydrogenase 3 in *S. typhimurium* (92) FNR-unabhängig.

Regulation einiger anaerob induzierbarer Operone in *E. coli*

Nukleotidsequenzen von Genen und Operonen, die für anaerob induzierbare Genprodukte kodieren, liefern die Voraussetzung für eine Feinstrukturanalyse der betreffenden Promotoren. Dadurch lassen sich cis-ständige Regulatorelemente im Promotorbereich identifizieren und auch die Bedeutung von trans-regulierenden Faktoren für die Regulation der Expression auf Transkriptionsebene aufklären.

Bisher zählen zu den gut untersuchten Operonen, neben dem *pfl*-Operon (für Pyruvatformiatlyase) (164), nur solche, die für Enzyme der anaeroben Elektronentransportsysteme kodieren und wie *pfl* FNR-abhängig sind, nämlich Nitratreduktase (*nar*), Nitritreduktase (*nir*) und Fumaratreduktase (*frd*). Eine weitere Gemeinsamkeit in der Regulation dieser vier Systeme ist die Induzierbarkeit der entsprechenden Operone durch die jeweiligen Enzymsubstrate Pyruvat, Nitrat, Nitrit und Fumarat (42, 60, 70, 157, 164, 186).

Die Promotorregion des *nar*-Operons (Nitratreduktase) konnte in den letzten Jahren sehr gut charakterisiert werden. Es stellte sich dabei heraus, daß "Nitrat" und "Anaerobiose" zwei voneinander unabhängige Effektoren der Genregulation sind. In diesem Zusammenhang wurde außerdem deutlich, daß zwei getrennte Bereiche in der Promotorregion als cis-regulatorische Elemente für "anaerobe Induktion" und "Nitratinduktion" erforderlich sind (112, 113, 114). Während nach der gängigen Ansicht dem FNR-Protein die entscheidende Rolle bei der "anaeroben Induktion" zukommt, ist für die "Nitratinduktion" ein weiteres Regulatorprotein, NARL, erforderlich (113). Interessanterweise konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden, daß das NARL-Protein neben seiner Aktivatorfunktion (Nitratinduktion des *nar*-Operons) auch eine Repressorfunktion besitzt. Es stellt nämlich die entscheidende regulatorische Komponente für die Nitratrepression des *frd*-Operons (Fumaratreduktase) dar (88, 97, 188).

Das *frd*-Operon wird auf der Transkriptionsebene in komplizierter Weise reguliert (95, 96). Es ist neben dem *pfl*-Operon (G. Sawers,

persönliche Mitteilung) auch das erste anaerob regulierte System, an dem nachgewiesen wurde, daß es durch verschiedene trans-regulatorische Faktoren positiv und negativ gesteuert wird: Zum einen wirken das FNR-Protein und ein unbekannter Faktor, der die Fumaratinduktion vermittelt, als Aktivatoren, und zum anderen reprimieren das NARL-Protein und ein unbekannter Molybdän-Effektor (87) unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von Nitrat die Transkription des *frd*-Operons.

Formiathydrogenlyase (FHL) Komplex von E. coli

Wie im letzten Abschnitt erläutert wurde, sind bereits viele wichtige Details der Regulation der Enzyme für anaerob induzierte Elektronentransportsysteme bekannt. Diese lassen sich momentan aber noch nicht zu einem schlüssigen Gesamtmodell für die "anaerobe Regulation" zusammenfügen. Im Vergleich dazu ist die Regulation typischer Gärungsenzyme allerdings noch weitgehend unklar. Der für das anaerobe Zellwachstum nicht essentielle Enzymkomplex der Formiathydrogenlyase (FHL) stellt für die Untersuchung dieser Frage ein ausgezeichnetes Modellsystem dar.

Der FHL Komplex ist im Gärungsstoffwechsel für die Bildung von Wasserstoff und Kohlendioxid aus Formiat verantwortlich und ist nach Anzucht unter aeroben Bedingungen, sowie unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Nitrat, nicht nachweisbar (199). Die Funktion dieses Komplexes ist aufgrund der Labilität der einzelnen Komponenten noch weitgehend unbekannt. Der FHL Komplex besteht aus einer Formiatdehydrogenase H (FDH_H), unbekannten Redoxcarriern und einer Hydrogenase (69, 144).

Bisher sind nur relativ wenige Daten über Genetik und Biochemie der für die Gasbildung notwendigen Hydrogenase (Isoenzym 3) bekannt (162). Von Pecher et al. (143) konnte eine Mutante (M17s; hyd-17) isoliert werden, die einen Defekt in dieser Hydrogenase trägt. Die Verfügbarkeit von Antikörpern gegen die gut charakterisierten Hydrogenase-Isoenzyme 1 und 2 (11, 165) ermöglichte den Nachweis, daß das hyd-17 Allel keinen pleiotropen Effekt auf alle

Hydrogenase-Isoenzyme ausübt, sondern zu einem spezifischen Ausfall der Hydrogenase 3 Aktivität führt (25).

Formiatdehydrogenase H (FDH_H) ist eine von den beiden in *E. coli* vorkommenden Formiatdehydrogenasen (144). Im Gegensatz zu der äußerst labilen FDH_H wurde die zweite Formiatdehydrogenase (FDH_N) biochemisch und immunologisch bereits gut analysiert (47, 59). Sie katalysiert unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Nitrat die Spaltung von Formiat und die Übertragung der Elektronen auf den aktiven Nitratreduktasekomplex. Beide Formiatdehydrogenasen (FDH_H und FDH_N) benötigen für ihre Aktivität Eisen, Molybdän und Selen (111, 146).

Das Gen (*fdhF*) für das 80 kDa Selenopeptid der Formiatdehydrogenase H wurde in den letzten Jahren genetisch eingehend untersucht. Es ist der einzige, bisher bekannte Genort, der für eine Untereinheit der FDH_H kodiert.

Eine Analyse der *fdhF*-Nukleotidsequenz ergab den unerwarteten Befund, daß sich in der kodierenden Sequenz an Aminosäureposition 140 ein TGA-(Stopp)-Kodon befindet (142, 210). Weiterhin konnte der Nachweis dafür erbracht werden, daß dieses Stopp-Kodon in der speziellen genetischen Umgebung "überlesen" werden kann und für den cotranslationalen Einbau der ungewöhnlichen Aminosäure Selenocystein essentiell ist (211).

Regulation der Formiatdehydrogenase H

Die Expression des *fdhF*-Gens wird auf der Ebene der Transkription in komplexer Weise reguliert (23, 143, 204). Folgende Phänomene werden beobachtet:

- a) Induktion unter anaeroben Bedingungen durch Formiat;
- b) Repression unter aeroben Bedingungen;
- c) Repression unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Nitrat, Nitrit, Trimethylamin-N-oxid, Fumarat.

Die molekularen Mechanismen, die zu einer solchen Steuerung der Genexpression führen und damit eine Expression nur unter reinen Gärungsbedingungen garantieren, sind noch ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, durch eine Feinstrukturanalyse des fdhF-Promotorbereichs wichtige Kontrollelemente zu identifizieren, um so Hinweise auf die beteiligten Regulationsmechanismen zu erhalten.

* * *

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

I. Verwendete Bakterienstämme und Bakteriophagen

Für allgemeine Transduktionen wurde der Bakteriophage P₁kc (aus der Institutssammlung) verwendet.

Tabelle 1 enthält eine Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme (Derivate von Escherichia coli K12).

Tabelle 1: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
MC4100	$\Delta(\text{argF-lac})\text{U169, araD, flbB, ptsF, deoC, relA, rpsL}$	37
M9s	MC4100, $\text{fdhF}::\text{Mud1}(\text{Ap}^{\text{r}}, \text{lac})\text{ts}^+$	143
FM420	MC4100, recA56	208
FM909	MC4100, ΔfdhF	142
FM911	MC4100, $\Delta \text{fdhF, recA56}$	210
WL8	MC4100, $\text{fdh-8}::\text{Mu cts dl}(\text{Ap}^{\text{r}}, \text{lac})$	109
WL318	WL8, $\Delta(\text{srl-recA})306::\text{Tn10}$	25
BN450	MC4100, $\text{ntrA208}::\text{Tn10}$	A, 24
BN451	BN450, $\Delta \text{ntrA208}::\text{Tn10}$	A
BN452	BN451, $\Delta(\text{srl-recA})::\text{Tn10}$	A
BN950	FM909, $\text{ntrA208}::\text{Tn10}$	A, 24
BN460	MC4100, $\text{fur31, zbf}::\text{Tn10}$	A
SV51	MC4100, $\text{chlD}::\lambda \text{placMu53}$	168
ET6016	MC4100, $\text{rha, } \Delta \text{gln(LG)228}$	CGSC
ET6017	MC4100, $\text{rha, } \Delta \text{gln(ALG)229}$	CGSC
ET6018	MC4100, $\text{rha, } \Delta \text{gln(ALG)230}$	CGSC, 9
JRG861a	$\text{fnr, trpA, trpR, gal, rpsL}$	106
FM56	JRG861a, $\Delta(\text{argF-lac})\text{U169}$	A, 25
BN5600	FM56, $\Delta(\text{srl-recA})306::\text{Tn10}$	A, 25
BN4600	FM56, $\text{fnr}^+, \Delta(\text{srl-recA})306::\text{Tn10}$	A, 25
ET8000	$\text{lacZ}::\text{IS1, gyrA, hutC}_K$	120

Stamm	Genotyp	Referenz
ET8045	ET8000, ntrA208::Tn10	120
ET8894	ET8000, Δ(rha-ntrC)1703::Mu cts62	120
GP8047	glnG10::Tn10	156
YMC15	Δ(argF-lac)U169, hutC _K , thi, endA, hsdR, glnL302	41
H1673	fur31, zbf::Tn10	K.Hantke
DH1	thi, hsdR, recA, endA, relA, supE	75
JC10289	Δ(srl-recA)306::Tn10	86
WA321	thi, thr, leuB, proA, his, argE, ara, lac, gal, xyl, mtl, tsx, rpsL, supE, dam	55
K38	phoA, pit, tonA, ompF, relA	117

=====
ts⁺: temperaturinsensitiv; Index K: Gen aus *Klebsiella pneumoniae*
A: diese Arbeit

II. Plasmidvektoren und rekombinante Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmidvektoren und rekombinanten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 3 enthält eine Zusammenstellung der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide, die im Teil "Ergebnisse" ausführlich beschrieben werden.

Tabelle 2: Plasmidvektoren, rekombinante Plasmide

Plasmid	Phänotyp/Genotyp	Referenz
pBR322	Ap ^r , Tet ^r	28
pACYC184	Cm ^r , Tet ^r	39
pUC19	Ap ^r , lac'IPOZ'α	137
pGA46	Cm ^r	6
pMC1403	Ap ^r , lac'ZYA	36

Plasmid	Phänotyp/Genotyp	Referenz
pFM52	Ap ^r , ϕ (fdhF'-lacZ)hyb268	210
pFM54	Ap ^r , ϕ (fdhF'-lacZ)hyb420	210
pKY102	Ap ^r , recA ⁺	86
pJF118EH	Ap ^r , tacP, rrnB, lacI ^q	63
pHP45 Ω	Ap ^r , Sm ^r , Spk ^r	147
pHC79	Ap ^r , Tet ^r	83
pT7-5	Ap ^r , T7 ϕ 10	S.Tabor
pT7-6	Ap ^r , T7 ϕ 10	S.Tabor
pGP1-2	Km ^r , T7 Gen 1	192
pFM20	Cm ^r , fdhF ⁺	210
pFM3	Cm ^r , fdhF ⁺	210
pMM17	Ap ^r , ntrA _K ⁺	129
pMM14	Km ^r , ntrC _K ⁺	125
PMC71A	Cm ^r , nifA _K ⁺	30
pRJ1008	Ap ^r , ϕ (nifD _B '-lacZ)hyb	4
pRJ6011	Ap ^r , nifH _B (UAS)	M.Gubler
pSMM4	Ap ^r , ϕ (nifH _K '-lacZ)hyb	32
pSMM9	Ap ^r , ϕ (nifU _K '-lacZ)hyb	32
pSMM161	Ap ^r , ϕ (nifB _K '-lacZ)hyb	32
pFMcos1	Ap ^r , fdh-8 ⁺ , gln(ALG) ⁺	F.Zinoni
pFMcos5	Ap ^r , fdh-8 ⁺	F.Zinoni

=====

UAS: "upstream activator sequence"

Index: K, Gen aus *Klebsiella pneumoniae*

B, Gen aus *Bradyrhizobium japonicum*

siehe folgend Tabelle 3

Tabelle 3:Im Teil "Ergebnisse" beschriebene rekombinante Plasmide
=====

Plasmide	Beschreibung (Seite)
pBN2	32
pBN201 - pBN222	44
pBN80	55
pBN280	60
pBN208 Ω	60
pBN208 $\Delta \Omega$	60
pBN17	65
pBN18	65
pBN61	70
pBN600	74
pBN601	74
pBN605	72
pBN606	72
pBN302	78
pBN304	
pBN311	
pBN314	
pBN316	
pBN2101 - pBN2109	89
pBN4, pBN5	93
pBN411 - pBN415	93
pBN411 Ω	96
pBN211 Ω	96
pBN511, pBN513	93
pBN530	97
pBN250	99
pBN4111	99
pBN4311, pBN4411	101
pBN211tac	104
pBN70, pBN71	107
pBN100, pBN4100	117
pBN4400, pBN4900	118
pBN4161	118

=====

III. Nährmedien

Die folgenden Medien wurden verwendet:

Vollmedien:

LB: 1 % Trypton
 0,5 % Hefeextrakt
 1 % NaCl (1,5 % Agar)

TGYES: LB + 0,5 % Glukose, (1,5 % Agar)

TGYEP: verändert nach Begg et al., 1977 (17):
 1 % Trypton
 0,5 % Hefeextrakt
 1 $\mu\text{M Na}_2\text{MoO}_4$
 1 $\mu\text{M Na}_2\text{SeO}_3$
 bei aeroben Anzuchten: 0,4 % Glukose
 bei anaeroben Anzuchten: 0,8 % Glukose
 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5)
 (1,5 % Agar)

MacConkey Agar:

40 g Difco Fertigagar auf 1 l deionisiertes Wasser
0,3 % Agar
1 % Zucker

MacConkey Nitrat Agar (14):

40 g Difco Fertigagar auf 1 l deionisiertes Wasser
10 g KNO_3
1 g Glycerin
0,5 g Na-Formiat
0,1 g Glukose
3 g Agar

YM:

1 % Trypton
0,5 % NaCl
0,01 % Hefeextrakt
0,2 % Maltose

R-Agar:

für P₁-Plattenlysate:

1 % Trypton
0,1 % Hefeextrakt
0,8 % NaCl
0,1 % Glukose
2 mM CaCl₂
1,2 % Agar

Fusarsäure/Aureomycin Agar für Kurieren von Tn10 (121):

0,5 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
1 % NaCl
1 % NaH₂PO₄
0,1 mM ZnCl₂
1,5 % Agar

für 1 l Medium:

12 mg Fusarsäure
50 mg Aureomycin

EMB-Agar:

Plattensystem, verwendet zu NG-Mutagenese:

1 % Pepton
0,2 % K₂HPO₄
0,1 % Laktose
0,04 % Eosin-Y gelblich
0,0065 % Methylenblau
1,5 % Agar

Minimalmedien:

Werkman-Medium: (62)

50 mM Na_2HPO_4
100 mM KH_2PO_4
1 mM MgSO_4
0,1 mM CaCl_2
15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
pH 7,0 (1,5 % Agar)

Se-freies Grundmedium:

Für die Herstellung des Selen-Mangelmediums wurden nur Glaswaren verwendet, die vorher mit Chromschwefelsäure und doppelt destilliertem Wasser gereinigt worden waren.

150 mM KH_2PO_4
1 mM MgCl_2
15 mM NH_4Cl
0,1 mM CaCl_2
5 μM NiCl_2
10 μM FeCl_3
10 μM Na_2MoO_4

Pro 1 l Grundmedium wurde 1 ml folgender Spurenelementlösung zugesetzt:

30 μM CoCl_2
80 μM MnCl_2
10 μM ZnCl_2 .

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 6,5 eingestellt.

Für Minimalagar: Grundmedium mit 1,5 % Agarose.

W-Medium: (179)

60 mM K_2HPO_4
33 mM KH_2PO_4
0,5 mM MgSO_4
(pH 7)

Supplemente:

Supplemente wurden nach dem Autoklavieren der Grundmedien in folgenden Endkonzentrationen zugegeben:

Aminosäuren

- zur Suppression von Biosynthese-Defekten: 40 µg/ml
- Selen-Mangelmedium: 80 µg/ml Cystein als Schwefelquelle
- ntrA⁻ oder glnA⁻ Stämme: 0,2 % Glutamin (auch in Vollmedien)
- Anzuchten im W-Medium:
0,2 % Glutamin oder 0,2 % (NH₄)₂SO₄ (frisch sterilfiltriert) als Stickstoffquelle

Purine und Pyrimidine 20 µg/ml

Vitamin B₁ 5 µg/ml

Kohlenstoffquellen:

C-Quellen wurden in folgenden Konzentrationen (w/v) verwendet:

aerobe Anzuchten:

Glukose 0,4 %
Glyzerin 0,8 %
Na-Succinat 0,8 %

anaerobe Anzuchten:

Glukose 0,8 %
Glyzerin 0,8 %

Antibiotika:

Den Selektivmedien wurden die Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	30 µg/ml (Mud1 lysogene Stämme)
	100 µg/ml (plasmidhaltige Stämme)
Chloramphenicol	30 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Spektinomycin	80 µg/ml
Tetrazyklin	15 µg/ml

IV. Standardpuffer

Folgende Standardpuffer wurden verwendet:

<u>TBE</u> (123)	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA	<u>TE</u> (123)	10 mM Tris-Cl 1 mM EDTA pH 8,0
<u>SSPE</u> (123)	150 mM NaCl 10 mM NaH_2PO_4 1 mM EDTA pH 7,4	<u>Blotpuffer für Northern Blot</u> (133)	0,025 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6,5)
		<u>Laufpuffer für RNA-Gele</u> (108)	2,2 M Formaldehyd 0,018 M Na_2HPO_4 0,002 M NaH_2PO_4

V. Anzuchten der Bakterien

Das Standardmedium für alle Anzuchten war LB-Vollmedium. Sofern nichts anderes angegeben, wurden Zellen zur Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität in TGYEP-Medium kultiviert. Die Inkubationstemperatur war normalerweise 37°C; nur pMC71A-haltige Stämme wurden bei 28°C angezogen:

Aerobe Anzuchten:

Aerobe Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben (Füllmenge: ein Zehntel des Nennvolumens) in Wasserbadschüttlern (New Brunswick, Modell G76) bei 250 bis 300 Umdrehungen/min angezogen.

Anaerobe Anzuchten:

Anaerobe Anzuchten zur Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität erfolgten in luftdicht verschlossenen Serumflaschen unter Stickstoffatmosphäre (0,5 bar Überdruck).

Platten wurden im Anaerobentopf unter Stickstoffatmosphäre im Brutraum inkubiert.

VI. Genetische Methoden

1. Transduktionen

Allgemeine Transduktionen zum Transfer von genetischen Markern wurden mit $P_{1}kc$ -Phagen nach der von Miller beschriebenen Methode durchgeführt (130).

2. Kurieren von Transposon Tn10

Transposon-freie Derivate von Tn10-haltigen Stämmen wurden nach der Methode von Maloy und Nunn durch Bebrütung auf Fusarsäure/Aureomycin Agar isoliert (121).

3. Test genetischer Marker

fnr: Die Selektion auf fnr^{+} erfolgte auf Minimalagar mit Glycerin und Nitrat bei anaerober Bebrütung (106).

FDH_N : Der Phänotyp von FDH_N - Mutanten wurde auf MacConkey Nitrat Agar (14) überprüft (Auftreten einer charakteristischen Rotfärbung).

ntr: Stämme mit Mutationen in verschiedenen Genen des ntr-Regulons (ntrA, ntrB, ntrC, glnA) wachsen auf Minimalagar nur in Gegenwart von 0,2 % Glutamin (119).

fdh: FDH_H -Aktivität wurde entweder durch Gasbildung in Durhamröhrchen (56) oder durch Reduktion von Benzylviologen (Plattenüberschichtung) (122) nachgewiesen.

fur: Stämme mit Mutationen im Regulatorgen fur zeigen kein Wachstum auf Minimalagar mit Succinat (78).

VII. Molekulargenetische Methoden

1. Isolierung von Plasmid DNA

a) Schnellpräparation:

Die Präparation von kleineren Mengen DNA (2 - 10 μ g) erfolgte aus 2 ml beziehungsweise 5 ml Übernachtskulturen nach der Methode von Birnboim und Doly (26). Die so isolierte Plasmid-DNA wurde anschließend nach der von Pelham (1985)

beschriebenen Methode (145) weiter gereinigt (Entfernung von ribosomaler RNA, SDS, Protein). Plasmid-DNA, die für die Sequenzierung nach der enzymatischen Methode bestimmt war, wurde daraufhin noch zusätzlich mit RNaseA behandelt (2 h, 37°C) und nach einer weiteren Phenolextraktion und Fällung eingesetzt.

b) Präparation im großen Maßstab:

Für die Sequenzierung nach der chemischen Methode, für Bal31 Verkürzungen und Klonierungen wurde DNA benötigt, die über einen Caesiumchloridgradienten gereinigt worden war. Die Anzucht der Zellen erfolgte dazu in 500 ml Selektionsmedium bis zu einer optischen Dichte von OD_{420} von 0,8. Der Plasmidgehalt wurde daraufhin durch 12- bis 16-stündige Inkubation in Gegenwart von 150 µg/ml Chloramphenicol beziehungsweise 300 µg/ml Spektinomycin amplifiziert. Die Aufarbeitung der Zellen geschah nach der von Clewell und Helinski beschriebenen "cleared lysate" Methode (44). Die Abtrennung von RNA, chromosomaler DNA und Protein erfolgte durch zweimalige Gleichgewichtszentrifugation im Caesiumchloridgradienten (123).

2. Isolierung von RNA

Gesamt-RNA wurde aus Zellen präpariert, die bis zur Mitte der exponentiellen Phase kultiviert worden waren. (Für Northern Blot: Anzuchten in Minimalmedium und Zellernte bei einer OD_{600} von 1. Für S_1 -Kartierung: Anzuchten in TGYEP Vollmedium und Zellernte bei einer OD_{420} von 1.) Die Aufarbeitung der Zellen und die anschließende Isolierung der RNA erfolgte nach der "heißen Phenolmethode" (1).

3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Je nach Bestimmung der DNA-Fragmente wurden verschiedene Methoden der Isolierung angewendet.

Die Isolierung von markierten Fragmenten für die Sequenzierung nach der chemischen Methode, die Isolierung von Fragmenten nach Nukleasebehandlung und Linkerligation und die Isolierung

von geringen DNA-Mengen ($<1 \mu\text{g}$) erfolgte aus leicht schmelzender Agarose (low melting agarose) (123).

Für die Routine-Klonierungen wurden die gewünschten DNA-Fragmente entweder durch "Ausfrieren" aus Agarose (20) oder über Bindung an DEAE-Membranen extrahiert (Schleicher und Schüll, NA-45 DEAE-Membran) (57).

4. Isolierung von Oligonukleotiden aus Polyacrylamidgelen

Oligonukleotidbanden wurden durch das sogenannte "Shadowing" in der Gelmatrix detektiert. Dabei wurde das Gel auf eine mit Fluoreszenzfarbstoff imprägnierte DC-Platte gelegt und mit kurzwelligem UV-Licht bestrahlt (254 nm). Die Oligonukleotidhaltigen Gelstückchen wurden darauf möglichst gut zerkleinert und in wässriger Suspension zwölf Stunden bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die Oligonukleotide aus $0,3 \text{ M}$ Natriumacetat + $0,01 \text{ M}$ MgCl_2 + 3 Volumenanteile Äthanol (100 %) bei -20°C gefällt.

5. Klonierungen

a) Enzymatische in vitro Reaktionen an DNA:

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, die Modifikation der DNA-Enden mit DNA-Polymerase I Klenow-Fragment ("Auffüllreaktion"),mung bean Nuklease (Abbau überhängender Enden), alkalischer Phosphatase (Dephosphorylierung der 5' Enden) und die Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA Ligase wurden nach Standardmethoden (123) und nach Herstellerangaben durchgeführt.

Nuklease-Bal31-Verkürzung der Promotorregion:

Um die Reaktionsgeschwindigkeit von Nuklease Bal31 möglichst herabzusetzen, wurde der Reaktionsansatz bei 20°C inkubiert. Plasmid pBN2 wurde mit $0,2$ Einheiten Bal31/ μg DNA, Plasmid pBN208 mit $0,1$ Einheiten Bal31/ μg DNA behandelt. Nach dem "Auffüllen" eventueller 5' überhängender Enden mit Klenow-Polymerase wurden 8mer EcoRI Linker (dGGAATTCC) ligiert.

Verkürzung mit "Slow-Bal31" Nuklease:

In diesem Verkürzungsexperiment wurde streng nach Herstellerangaben (GENOFIT, Heidelberg) vorgegangen. Dabei wurden 1 pmol DNA-Enden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 0,4 Einheiten "Slow-Bal31" Nuklease bei 30°C behandelt, wobei eine Abbaurrate von 2 bp/min erzielt wurde. Nach dem "Auffüllen" 5' überhängender Enden wurden 10mer EcoRI Linker (dCGGAATTCCG) ligiert.

Klonierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden:

Folgende Oligonukleotide wurden freundlicherweise von P. Buckel (Boehringer Mannheim GmbH) und R. Mertz (Genzentrum, München) synthetisiert und zur Verfügung gestellt:

Für Plasmid pBN4:

Oligo 1 (46mer): 5'-CGATGGCTGTCACGCGGTATTTTCGTTTCGTCACGTCAA
AAACTGACG-3'

Oligo 2 (54mer): 5'-AATTCGTCAAGTTTTCGCTGACGAAACGAAATACCGC-
GTGACAGCCATCGACGT-3'

Für Plasmid pBN5:

Oligo 3 (55mer): 5'-AATTCGATGGCTGTCACGCGGTATTTTCGTTTCGTAC-
GTCAAAACTGACGGACGT-3'

Oligo 4 (47mer): 5'-CCGTCAGTTTTCGCTGACGAAACGAAATACCGCGTG-
ACAGCCATCG-3'

Für Plasmid pBN4311:

Oligo 5 (22mer): 5'-CTTCGTCACGTCAAAGTTGACG-3'

Oligo 6 (30mer): 5'-AATTCGTCAACTTTGACGTGACGAAGACGT-3'

Für Plasmid pBN4411:

Oligo 7 (28mer): 5'-CTTTCGTTTCGTCACGTCAAAGTTGACG-3'

Oligo 8 (36mer): 5'-AATTCGTCAACTTTGACGTGACGAAACGAAAGACGT-3'

Die Hybridisierung der komplementären, gereinigten Oligonukleotide wurde in folgender Weise durchgeführt: die Mischung wurde 2 min auf 65°C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die Klonierung der doppelsträngigen Oligonukleotide wurden jeweils 0,3 pmol Vektorfragment mit 0,5 pmol doppelsträngigen Oligonukleotiden ligiert.

b) Transformation:

Für die Transformation von E. coli Zellen mit Ligationsansätzen wurde die Standard-Calciumchlorid-Methode angewendet (123). Für das Umtransformieren von rekombinanten Plasmiden in verschiedene Bakterienstämme wurde nach einer Schnellmethode von Merrick et al. vorgegangen (127).

6. In vitro ³²P-Markierung von DNA

Nick Translation:

Für die Verwendung von DNA-Fragmenten als Hybridisierungs-sonden wurden diese nach Standardmethoden (123) mit DNA-Polymerase I und α -³²P-dATP (3.000 Ci/mmol) radioaktiv markiert.

5' beziehungsweise 3' Endmarkierung von DNA-Fragmenten:

Die Endmarkierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit T4 Polynukleotidkinase und γ -³²P-ATP (7.000 Ci/mmol) beziehungsweise DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) und einem geeigneten α -³²P-dNTP (3.000 Ci/mmol) nach beschriebenen Methoden (123).

5' Endmarkierung von Oligonukleotiden:

Oligonukleotide wurden mit einem 10%-igen molaren Überschuß an γ -³²P-ATP (5.000 Ci/mmol) und T4 Polynukleotidkinase radioaktiv markiert.

7. Hybridisierungstechniken

a) Transfer von Nukleinsäuren:

Die RNA wurde für die "Northern Blots" mit dem Kapillarverfahren aus Formaldehydgelen auf "GeneScreen" Membranen transferiert (GeneScreen: New England Nuclear) (133).

b) Hybridisierung mit "Northern Blots":

Die Prähybridisierung wurde bei 37°C zwei Stunden in folgendem Hybridisierungspuffer durchgeführt: 6 x SSPE, 50 % deionisiertes Formamid, 0,7 % Magermilchpulver (93).

Während der Hybridisierung wurden die "GeneScreen" Membranen 14 Stunden bei 37°C in obigem Puffer inkubiert (59 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$), wobei 2×10^6 cpm/ml ^{32}P -markierte Sonden-DNA hinzugefügt wurden.

Anschließend wurden die Membranen bei Raumtemperatur je zweimal mit folgenden Puffern gewaschen: a) 2 x SSPE; 0,1 % SDS; 0,7 % Magermilchpulver. b) 0,1 x SSPE; 0,1 % SDS; 0,7 % Magermilchpulver. Die getrockneten GeneScreen Membranen wurden mit X-Ray 90 Röntgenfilm exponiert.

c) DNA Dot Blot und Hybridisierung mit markierten Oligonukleotiden:

Diese Methode wurde zur Detektion von rekombinanten Plasmiden bei der Klonierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden angewendet. Nach der Schnellpräparation der Plasmid DNA wurde diese auf folgende Weise denaturiert: Die gefällte und getrocknete DNA wurde 10 min lang bei Raumtemperatur mit Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH; 0,2 mM EDTA) behandelt; das Gemisch wurde durch Zugabe von Ammoniumacetat (ad 0,2 M) neutralisiert und die DNA wurde daraus anschließend gefällt. Die denaturierten DNA-Proben wurden sofort in wässriger Lösung auf Nitrocellulose-Filter getropft.

Die Prähybridisierung erfolgte zwei Stunden bei 37°C in folgendem Puffer: 4 x SSPE; 50 % Formamid; 1 mM ATP; 0,7 % Magermilchpulver. Für die Hybridisierung konnten die 5' endmarkierten Oligonukleotide direkt (ohne Abtrennung von nicht eingebautem γ - ^{32}P -ATP) eingesetzt werden. Das übrige Vorgehen verlief nach Standardmethoden (siehe oben und 123).

8. Nuklease S1 Kartierung des Transkriptionsstarts

100 μg Gesamt-RNA aus E. coli MC4100 wurden nach beschriebenen Methoden (198) bei verschiedenen Temperaturen mit geeigneten 5' endmarkierten DNA-Sonden hybridisiert und anschließend mit 300 Einheiten S1 Nuklease eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden in geeigneten, denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt und diese später autoradiographiert.

9. DNA-Sequenzierung

a) Chemische Methode:

Die einfach 5' oder 3' endmarkierten DNA-Fragmente wurden basenspezifisch modifiziert (G-, T- und C+T-Reaktionen nach Maxam und Gilbert (124); A+G Reaktion nach Gray et al. (68)) und daraufhin mit Piperidin gespalten (124).

b) Enzymatische Methode:

Die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide wurden durch Sequenzierung nach der enzymatischen Methode überprüft. Dabei wurde die Methode des "Doppelstrangsequenzierens" von Chen und Seeburg (40) angewendet, mit folgenden Modifikationen: für das Sequenzieren mit DNA-Polymerase I (Klenow Fragment) nach den Angaben von Boehringer Mannheim (pUC-Sequenzierung) und für das Sequenzieren mit Sequenase nach den Angaben von USB (United States Biochemical Corporation).

Verwendete Oligonukleotid-Primer:

pBR322 (EcoRI, "clockwise"):

5'-GGCGTATCACGAGGCCCTTTTCG-3' (22mer)

pBR322 (HindIII, "counterclockwise"):

5'-GCGTTAGCAATTTAACTGTGAT-3' (22mer)

pBR322 (AatII, "clockwise"):

5'-TAGGGGTTCCGCGCACATTT-3' (20mer)

10. Plasmidmutagenese mit Nitrosoguanidin

Das Plasmid pBN208 wurde in vivo im E. coli Stamm FM909 (recA⁺) mit Nitrosoguanidin mutagenisiert. Eine exponentiell wachsende Kultur des plasmidhaltigen Stammes (OD₄₂₀ von 1) wurde mit Nitrosoguanidin (ad 25 µg/ml) versetzt und weitere 15 min im Wasserbad geschüttelt. Anschließend wurde der Plasmidgehalt durch Zugabe von Chloramphenicol (ad 150 µg/ml) amplifiziert. Nach weiteren 12 Stunden Inkubation wurde die Plasmid-DNA isoliert und für eine Subklonierung verwendet.

VIII. Elektrophorese-Techniken

1. Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Gelsystemen nach beschriebenen Methoden (123) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde TBE verwendet, dem zur Anfärbung der DNA Ethidiumbromid beigefügt worden war.

2. Trennung von DNA-Fragmenten in nativen Polyacrylamidgelen

Um geringe Größenunterschiede verschiedener DNA-Fragmente sichtbar machen zu können, wurden diese in vertikalen 8 % Polyacrylamidgelen aufgetrennt (123). Als Laufpuffer diente TBE-Puffer. Die Gelmatrix wurde nach der Elektrophorese mit einer TBE/Ethidiumbromid-Lösung behandelt.

3. Sequenzgele

Sequenzproben wurden in 6 %, 8 % oder 20 % Polyacrylamid-/7 M Harnstoff-Gelen (Verhältnis Acrylamid : Bisacrylamid = 19:1) aufgetrennt. Der Laufpuffer war ebenfalls TBE.

4. Reinigung von Oligonukleotiden in Polyacrylamidgelen

Oligonukleotide wurden, so wie die Sequenzproben, in Formamid-haltigem Auftragspuffer gelöst. Die Auftrennung geschah in 8 % oder 20 % Polyacrylamid-/7 M Harnstoff-Gelen (Verhältnis Acrylamid : Bisacrylamid = 29:1), wobei nicht mehr als 1 bis 2 OD₂₆₀ Einheiten/Spur (1 OD₂₆₀ = 20 µg/ml) aufgetragen wurden. Als Laufpuffer diente auch hier TBE.

5. Formaldehydgele zur Trennung von RNA

Für die Elektrophorese von Gesamt-RNA wurden 1 % Agarosegele in 2,2 M Formaldehyd verwendet. Die Gelbereitung und die Elektrophorese wurden nach den Angaben von Lehrach et al. (108) durchgeführt. Der Probenpuffer enthielt 2,2 M Formaldehyd und 50 % Formamid (108).

6. SDS Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

SDS Zellextrakte wurden nach den Angaben von Laemmli (105) in

12,5 % SDS/Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Blue R250.

IX. Expression im T7 RNA Polymerase/Promotor System

Plasmidkodierte Proteine wurden durch Expression im T7 RNA Polymerase/Promotor System (192) stark überproduziert und mit ^{35}S -Methionin nach den Angaben von S. Tabor und beschriebenen Methoden (190, 208) spezifisch markiert. Die Zellen wurden anschließend in Probenpuffer mit 2 % SDS und 100 mM DTT (47) aufgenommen und 3 min bei 95°C gekocht. Die SDS-Lysate wurden in 12,5 % SDS/Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färben und Entfärben wurden die Gele mit "Amplify" (Amersham Buchler, Braunschweig) behandelt und nach dem Trocknen bei -70°C mit Röntgenfilm exponiert.

X. Enzymaktivitätstests

1. β -Galaktosidase

Die Zellen wurden unter den angegebenen Bedingungen bis zur Mitte der exponentiellen Phase (OD_{600} von 0,4) angezogen und die β -Galaktosidaseaktivität wurde nach den Angaben von Miller bestimmt (130). Die Enzymaktivität wurde nach der Formel von Miller (130) berechnet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Anzuchten und Enzymtests.

2. Glutaminsynthetase

Nach der Anzucht in Minimalmedium (W-Salze) in Gegenwart von 0,2 % Ammoniumsulfat oder Glutamin als Stickstoffquelle wurden die Zellen bei einer OD_{420} von 1 geerntet. Die ganzen Zellen wurden nach der Methode von Bender et al. (19) mit CTAB permeabilisiert und in den Enzymtest eingesetzt. Die Enzymaktivität wurde nach den Angaben von Shapiro und Stadtman (172) mit dem γ -Glutamyl-Transferase-Test bestimmt, wobei am

Isoaktivitätspunkt der adenylierten und nicht adenylierten Form der Glutaminsynthetase (pH 7,15) die Gesamtaktivität ermittelt wurde.

3. β -Laktamase

Eine exponentiell wachsende Kultur wurde bei einer OD_{600} von 0,6 geerntet und aus dem Rohextrakt wurde die β -Laktamase Aktivität bestimmt. Nach der Methode von Lupski et al. (116) und Ross et al. (155) wurde die Spaltung von Cephaloridin (Enzymsubstrat) im Spektralphotometer verfolgt (Abnahme der OD_{255}). Der Test wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

XI. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration in Rohextrakten wurde nach der Methode von Lowry et al. (115) mit Rinderserumalbumin als Standard ermittelt.

XII. Liste besonderer Chemikalien und Bezugsquellen

Restriktionsenzyme, DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment), T_4 Polynukleotidkinase, Bal31 Nuklease, S1-Nuklease, alkalische Phosphatase, T4 DNA Ligase: Boehringer Mannheim GmbH, Pharmacia (Freiburg) oder New England Biolabs (Schwalbach).

"Slow Bal31" Nuklease: GENOFIT, Heidelberg

Sequenase: Renner GmbH, Dannstadt

Radioaktiv markierte Verbindungen: Amersham Buchler, Braunschweig oder New England Nuclear, Dreieich

Cephaloridin: Sigma Chemie GmbH, München

GeneScreen Membran: New England Nuclear, Dreieich

NC-Filter (BA85); DEAE Membran (NA-45): Schleicher und Schüll, Dassel

ERGEBNISSE

I. Konstruktion und Analyse einer fdhF'-lacZ Genfusion

Fusionen zwischen dem Gen eines zu untersuchenden Proteins und einem "Reporter"-Gen, wie zum Beispiel lacZ, bieten eine gute Möglichkeit, mit Hilfe eines einfachen enzymatischen Tests komplexe Regulationsmuster aufzuklären. Die Regulation des fdhF Gens auf der Ebene der Transkription war bereits im Rahmen der Diplomarbeit (23) durch die Analyse eines Mu d(Ap,lac) Fusionsstammes (M9s) untersucht worden. Die Verfügbarkeit des klonierten und sequenzierten fdhF Gens (210) bot die Möglichkeit, den Promotorbereich dieses anaerob regulierten Gens genauer zu charakterisieren. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher eine plasmidkodierte, translationale fdhF'-lacZ Genfusion konstruiert und analysiert.

1. Klonierungsstrategie

Die Klonierungsstrategie ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Der für die Klonierung verwendete Vektor pMC1403 (36) enthält ein promotorloses lac-Operon (beginnend am achten Codon von lacZ) inseriert in einem pBR322 Derivat (28). Eine kurze Linkerregion ermöglicht die Insertion von DNA-Fragmenten in den verschiedenen Leserahmen.

Das 870 bp Asp718/SmaI Fragment aus dem Plasmid pFM3 (210) enthält 750 bp 5' des Translationsstarts von fdhF und 39 Aminosäuren vom N-Terminus von fdhF. Dieses Fragment wurde nach dem "Auffüllen" der 5' überhängenden Enden in die EcoRI Schnittstelle des Vektors inseriert. Wie in Abbildung 1 gezeigt, ermöglicht dieses Vorgehen eine Fusionierung der beiden Gene fdhF und lacZ, wobei beide Leseraster erhalten bleiben. Eine Sequenzierung über die Fusionsstelle im Plasmid pBN2 bestätigte diese Konstruktion.

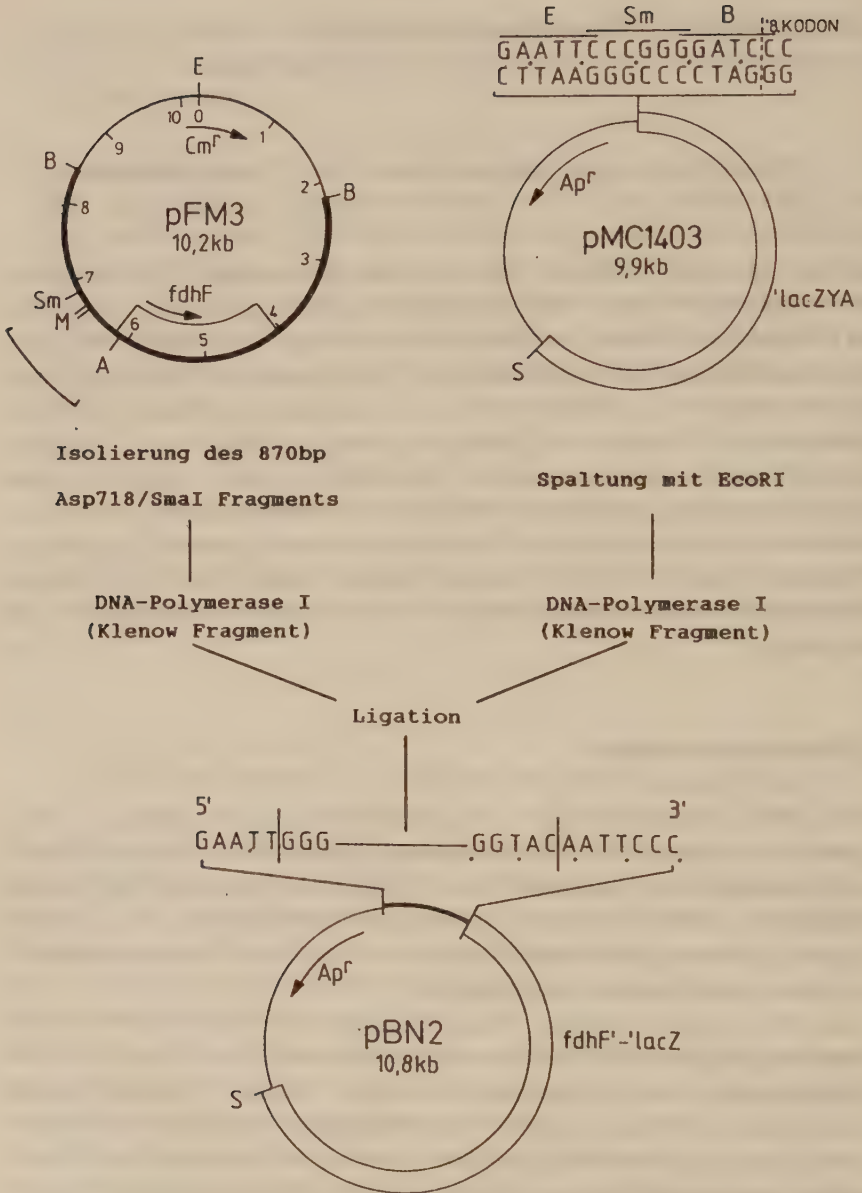


Abbildung 1:
Konstruktion der *fdhF'*-*lacZ* Genfusion (Plasmid pBN2)
| Fusionspunkte zwischen Vektor und kloniertem Fragment

2. Regulation der β -Galaktosidase Expression

Das Plasmid pBN2, das die fdhF'-lacZ Genfusion trägt, wurde in den Stamm FM911 (Δ fdhF, Δ lac, Δ recA) (210) transformiert; nach Anzucht unter verschiedenen Bedingungen wurde die β -Galaktosidase Aktivität ermittelt. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 zusammengefaßt:

Tabelle 4: β -Galaktosidase Aktivität der verschiedenen fdhF'-lacZ Fusionen

Stamm (relevanter Genotyp)	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller-Einheiten)				
	Glukose ^a	Glukose	Glukose	Glukose	Glukose
	(aerob)	30mM Formiat (aerob)	30mM Formiat (anaerob)	30mM Formiat (anaerob)	10mM Nitrat (anaerob)
M9s [fdhF::lac (Mud1)]	<1	<1	92	319	<1
FM911/pBN2 [fdhF'-lacZ]	31	33	400	3071	66

a: Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5)

Zum Vergleich ist die β -Galaktosidase Aktivität der singulären, chromosomalen fdhF::lac Operonfusion des Mud1 Insertionsstammes M9s angegeben. Folgende, für die Regulation des fdhF Gens wichtigen Schlüsse lassen sich daraus ableiten:

- a) Die plasmidkodierte fdhF'-lacZ Fusion zeigt das gleiche Regulationsmuster wie die chromosomal kodierte fdhF::lac Operonfusion von M9s: "Repression" durch Sauerstoff und Nitrat (anaerob), "Induktion" durch Formiat (anaerob).

- b) Im Gegensatz zu M9s (singuläre Operonfusion) ist in plasmidhaltigen (pBN2) Stämmen auch in Gegenwart von Sauerstoff und unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat eine geringe β -Galaktosidase Aktivität meßbar. Trotz der erhöhten Genkopienzahl der fdhF'-lacZ Fusion in dem plasmidhaltigen Stamm, sind die "Repressions"-Phänomene aber eindeutig zu beobachten.
- c) Durch exogen zugesetztes Formiat läßt sich die Expression unter anaeroben Bedingungen im Fall des Mud1 Insertionsstammes um das Dreifache, in dem plasmidhaltigen Stamm dagegen um das ungefähr Sieben- bis Achtfache steigern.

3. Gendosiseffekt

Die Untersuchung der Regulation mit Hilfe von plasmidkodierten Konstrukten ist nur möglich, wenn weitgehend sichergestellt werden kann, daß es durch die Erhöhung der Genkopienzahl nicht zur Limitierung wichtiger Faktoren für die Genexpression kommt. In diesem Zusammenhang spielen Aussagen über die Plasmidkopienzahl eine besondere Rolle. Nach Klotsky und Schwartz (100) besteht bei ColE1-Typ Plasmiden eine einfache Möglichkeit zur Bestimmung der Plasmidkopienzahl über die Messung der β -Laktamase Aktivität. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß die β -Laktamase Aktivität sehr gut mit der Plasmidkopienzahl korreliert, da das vektorkodierte bla-Gen konstitutiv expriert wird.

Ein Vergleich der β -Laktamase Aktivität in dem Mu d(Ap,lac) Insertionsstamm M9s (singuläres bla-Gen) mit der β -Laktamase Aktivität des plasmidhaltigen Stammes FM911/pBN2 sollte daher Aussagen über die Kopienzahl des lacZ-Fusionsplasmides erlauben. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse dieser Analysen zusammengefaßt.

Danach enthält der Stamm FM911 bei anaerober Anzucht unter den gleichen Bedingungen, bei denen auch die β -Galaktosidase Aktivität bestimmt wurde (siehe oben) ungefähr 10 bis 15 Kopien

des fdhF'-lacZ Fusionsplasmids pBN2. Die Expression der β -Galaktosidase wird unter anaeroben Bedingungen mit Formiat im plasmidhaltigen Stamm (FM911/pBN2) um das Zehnfache erhöht, verglichen mit dem MudI-Fusionsstamm M9s (siehe Tabelle 4). Das bedeutet, daß unter induzierenden Bedingungen ein eindeutiger Gendosiseffekt feststellbar ist und daß im Rahmen der Meßgenauigkeit die Erhöhung der β -Galaktosidase Aktivität ungefähr der Erhöhung der Zahl der Genkopien entspricht.

Tabelle 5: Bestimmung der Plasmidkopienzahl über Analyse der β -Laktamase Aktivität

Stamm	Spezifische β -Laktamase Aktivität ^b		
	Glukose ^a	Glukose	Glukose
	(aerob)	(anaerob)	30 mM Formiat (anaerob)
M9s	0,125 ($\pm$ 0,02)	0,115 ($\pm$ 0,02)	0,115 ($\pm$ 0,02)
FM911/pBN2	2,29 ($\pm$ 0,1)	1,47 ($\pm$ 0,1)	1,3 ($\pm$ 0,1)
Plasmidkopienzahl			
pro Zelle	15 - 20	10 - 15	10 - 15

a: Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5)

b: Angabe der Aktivitäten in μ Mol hydrolisiertes Cephaloridin/min x mg Protein

4. Zeitlicher Verlauf der Enzyminduktion

Um erste Hinweise zur anaeroben Aktivierung des fdhF Gens nach einem Übergang von aeroben zu anaeroben Wachstumsbedingungen zu erhalten, wurde die Kinetik der fdhF'-lacZ Induktion ver-

folgt. Der Stamm FM911/pBN2 wurde dazu unter aeroben Bedingungen bis zu einer OD_{600} von 0,2 angezogen und die Kultur wurde dann in mit Stickstoff gefüllte Serumflaschen transferriert (Zeitpunkt 0) und weiter bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und deren β -Galaktosidase Aktivität wurde bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 2 dargestellt.

Die anaerobe Aktivierung des *fdhF* Gens verläuft nach diesen Experimenten relativ langsam. Auch bei Zusatz des Induktors Formiat zum Kulturmedium wird erst nach ungefähr 30 bis 45 min der Beginn einer starken Zunahme der β -Galaktosidase Aktivität beobachtet.

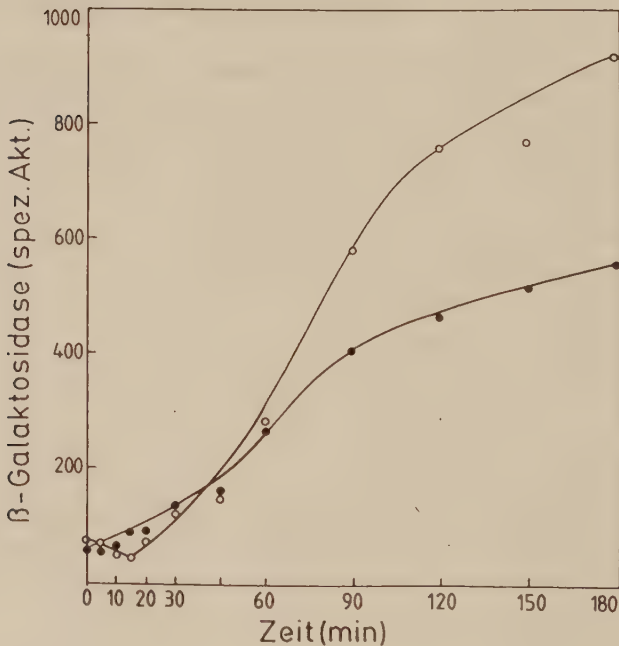


Abbildung 2: Kinetik der Enzyminduktion

Anzucht von FM911/pBN2 in TGYEP-Medium (pH 6,5)

●- Formiat; ○+ 30 mM Formiat

II. Einfluß von Selen auf die Expression von fdhF'-lacZ Genfusionen

Das Strukturgen fdhF für das 80 kDa Selenopolypeptid der Formiatdehydrogenase H (FDH_H) enthält an Aminosäureposition 140 ein TGA-(Stopp)-Kodon. Wie von F. Zinoni gezeigt werden konnte, bilden fdhF-Mutanten mit Deletionen 3' dieses TGA-Kodons verkürzte Selenopeptide (210). Diese Befunde sprechen sehr stark dafür, daß in diesem speziellen Fall das Stopp-Kodon "überlesen" werden kann. Folgende Fragen sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

- a) Ist das "Überlesen" dieses Stopp-Kodons vom Selen-Angebot im Kulturmedium abhängig?
- b) Gibt es einen Einfluß von Selen auf die Regulation der fdhF Transkription?

1. Anzuchten unter Selenmangel

Der erste Schritt zur Beantwortung dieser Fragen war die Entwicklung eines Minimalmediums mit möglichst geringem Selengehalt. Da die beiden Elemente Schwefel und Selen sehr eng miteinander vergesellschaftet sind, wurden alle Sulfatsalze in diesem Mineralsalzmedium durch Chloridsalze ersetzt. Als Schwefelquelle diente in diesen Anzuchten Cystein (experimentelle Details sind im Teil "Material und Methoden" beschrieben).

Vor der Anzucht in Flüssigkulturen wurden die Zellen auf entsprechenden Minimalmediumplatten in drei Passagen "ausgehungert" und anschließend in ein Gasteströhrchen überimpft. Zellen, die unter Selenmangel angezogen worden waren, bildeten nach 48 h kein oder nur sehr geringe Mengen Gas im Durhamröhrchen. Dagegen konnte durch Supplementierung des Minimalmediums mit $1 \mu\text{M Na}_2\text{SeO}_3$ wieder normale Gasbildung erreicht werden.

2. Expression der fdhF'-lacZ Fusionen in Abhängigkeit von Selen

Verschiedene fdhF'-lacZ Genfusionen mit unterschiedlichen Anteilen des fdhF Gens (Fusionspunkt entweder 5' oder 3' des TGA-Kodons) bieten eine gute Möglichkeit, einen eventuellen Effekt von Selen auf die Translation der Fusionsproteine zu zeigen. Abbildung 3 zeigt die in den folgenden Experimenten getesteten fdhF'-lacZ Fusionen mit ihren Fusionspunkten. Die beiden Plasmide pFM52 und pFM54 (210) wurden von F. Zinoni zur Verfügung gestellt.

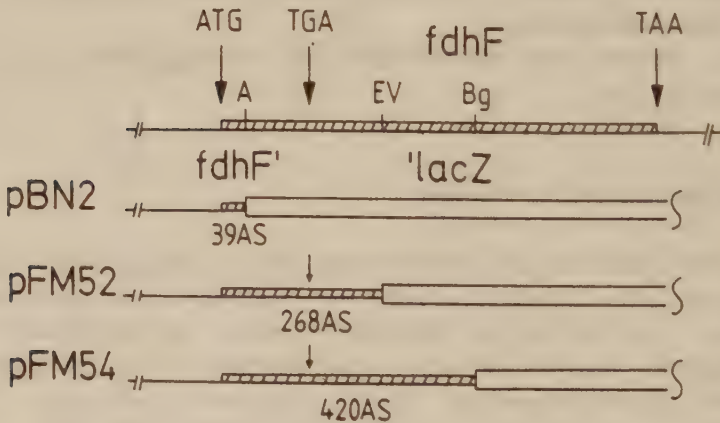


Abbildung 3:
Schematische Darstellung der verschiedenen
fdhF'-lacZ Fusionen

E. coli Stamm FM420 wurde mit den Plasmiden pBN2, pFM52 oder pFM54 transformiert und die Transformanten wurden, wie oben beschrieben, in Selen-Mangelmedium angezogen und danach in einen β -Galaktosidase Test eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt:

Tabelle 6: Effekt von Selenit auf die Expression der verschiedenen fdhF'-lacZ Fusionen

Plasmid ^a	Glukose ^b	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)		
		Glukose 30mM Formiat	Glukose 10 μ M SeO ₃ ²⁻	Glukose 30mM Formiat 10 μ M SeO ₃ ²⁻
pBN2	770	1.800	375	1.150
pFM52	40	30	805	1.250
pFM54	30	60	700	1.275

a: Rezipient für die verschiedenen Plasmide war E. coli FM420

b: Anzuchten in Selen-Mangelmedium (pH 6,5) unter anaeroben Bedingungen

Die Synthese der β -Galaktosidase durch FM420/pBN2 ist nach diesen Versuchen unabhängig vom Selenangebot im Kulturmedium und läßt sich durch Zugabe von Formiat weiter steigern. Dagegen kann in Zellen mit den Plasmiden pFM52 und pFM54 nur bei Anzucht in Anwesenheit von Selen im Kulturmedium β -Galaktosidase Aktivität in der erwarteten Höhe nachgewiesen werden.

Der Effekt von Selen auf die Expression von fdhF'-lacZ Fusionen wurde daraufhin näher untersucht und quantifiziert. Der Stamm FM420/pFM54 wurde in Selen-Mangelmedium mit steigenden

Konzentrationen Na_2SeO_3 unter anaeroben Bedingungen angezogen und anschließend auf β -Galaktosidase Aktivität hin untersucht. Die Grafik in Abbildung 4 zeigt die Höhe der β -Galaktosidase Synthese in Abhängigkeit von der im Medium angebotenen Selenkonzentration. Unter den gewählten Anzuchtbedingungen genügt demnach die Zugabe von 0,1 bis 0,2 μM Selenit, um wieder maximale $\text{fdhF}'\text{'-lacZ}$ Expression zu erreichen.

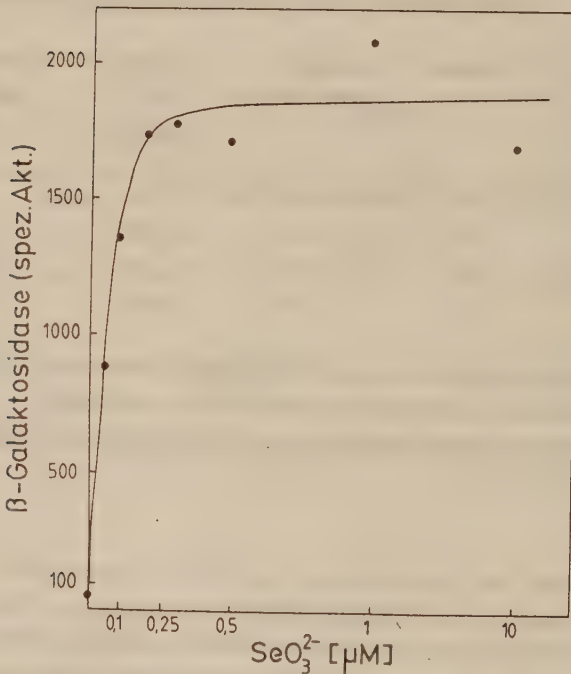


Abbildung 4:
Einfluß von Selen auf die Expression von $\text{fdhF}'\text{'-lacZ}$

3. Einfluß von Selen auf die Transkription von *fdhF*'-'*lacZ*

Wie im letzten Abschnitt gezeigt werden konnte, ist die Expression einer *fdhF*'-'*lacZ* Fusion mit einem *fdhF*-Anteil 5' des TGA-Kodons (Plasmid pBN2) unabhängig von Selen (siehe Tabelle 6). Dieses Ergebnis ist ein Hinweis dafür, daß die Transkription vom *fdhF* Promotor aus Selen nicht erfordert. Eine Analyse der Transkripte von Zellen nach Anzucht unter Selenmangel- und Selenüberschuß-Bedingungen sollte in dieser Arbeit näheren Aufschluß bringen.

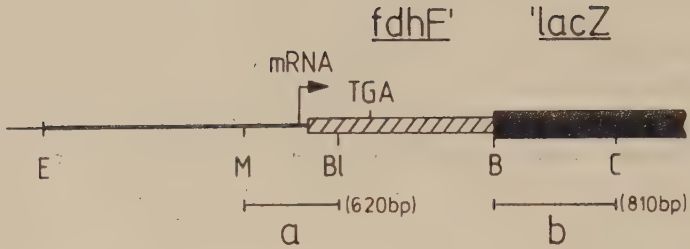
Der Stamm FM911/pFM54, der eine chromosomale Deletion des *fdhF* Gens (25) besitzt, wurde unter anaeroben Bedingungen zum einen unter Selenmangel und zum anderen mit Selenüberschuß ($+10 \mu\text{M SeO}_3^{2-}$) bis zu einer OD_{600} von 1 angezogen. Die Zellen wurden sofort geerntet. Ein Teil wurde zur Kontrolle in einen β -Galaktosidase Test eingesetzt, der zeigte, daß nur die Kultur, die mit Selen angezogen worden war, β -Galaktosidase exprimierte (Ergebnisse nicht gezeigt).

Aus einem anderen Teil der Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und mit verschiedenen DNA-Sonden (siehe Abbildung 5A) hybridisiert.

Eine Analyse der Autoradiogramme nach der Hybridisierung (Abbildung 5B) zeigt, daß mit beiden DNA-Sonden und in der RNS der Selenmangel- und Selenüberschuß-Zellen ein ungefähr 6 kb großes Transkript (Vergleich mit dem Laufverhalten von 23S rRNA und 16S rRNA) nachweisbar ist, das in seiner Größe dem Transkript der gesamten Fusion (*fdhF*'-'*lacZYA*: rechnerisch 6,3 kb) entspricht. Festzuhalten bleibt aber, daß in allen Fällen die Hybridisierungssignale nach Anzucht unter Selenmangel eindeutig schwächer sind, als nach Anzucht mit Selenüberschuß.

siehe folgend Abbildung 5A/5B

A



B

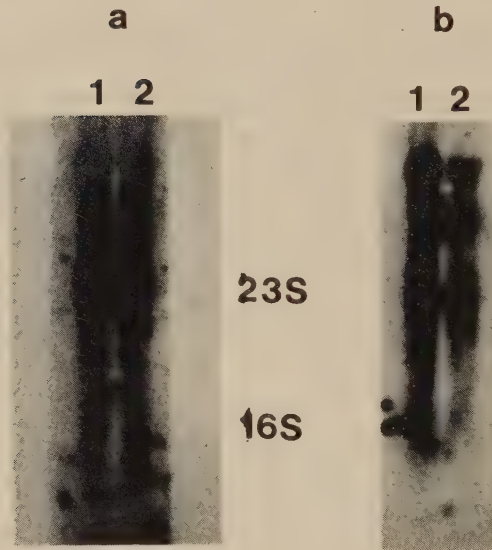


Abbildung 5:

Analyse der Transkripte unter Se-Mangelbedingungen

- A: Schematische Darstellung der DNA-Fragmente (a,b), die als Hybridisierungssonden verwendet wurden.
- B: Autoradiogramme nach Hybridisierung mit den unter 5/A angegebenen Sonden.
- Spur 1: Gesamt-RNA aus FM911/pFM54 (Anzucht mit Selen)
- Spur 2: Gesamt-RNA aus FM911/pFM54 (Anzucht ohne Selen)

III. Nuklease-Bal31 Verkürzung der fdhF Promotorregion

Wie in Kapitel I gezeigt werden konnte, wird die Expression der fdhF'-lacZ Fusionen auf der Ebene der Transkription in komplexer Weise reguliert. Eine schrittweise Verkürzung der 5' flankierenden DNA des fdhF Gens sollte die Identifizierung von eventuell vorhandenen cis-regulierenden DNA Elementen, die für die beobachteten Regulationsphänomene notwendig sind, ermöglichen.

1. Nuklease Bal31 Verkürzung

Die Verkürzung der fdhF Promotorregion mit Exonuklease Bal31 wurde in zwei Ansätzen durchgeführt. Abbildung 6 zeigt schematisch die Abfolge der einzelnen Schritte.

Plasmid pBN2 (siehe Kapitel I.1.) besitzt direkt am 5' Ende der klonierten fdhF'-lacZ Fusion keine Restriktionsschnittstelle. Deshalb wurde das ungefähr 1,5 kb große AatII Fragment aus pBN2 isoliert und mit Nuklease Bal31 verkürzt. Die genauen Bedingungen sind unter "Material und Methoden" beschrieben. Nach der Ligation von EcoRI Linkern und der Restriktion mit EcoRI und BamHI wurde die Fragmenteschar größenfraktioniert (Agarosegelelektrophorese) und in den mit EcoRI und BamHI gespaltenen Vektor pMC1403 (36) subkloniert. Die Größe der klonierten Fragmente in den verschiedenen Plasmiden wurde nach der Transformation des Ligationsansatzes aus 50 der erhaltenen Transformanten bestimmt. Es ergab sich, daß in diesem Experiment die 5' flankierende Region des fdhF Gens von -750 bis -240, bezogen auf den Translationsstart, verkürzt worden war. Acht dieser erhaltenen Plasmide (bezeichnet mit pBN201-pBN208) wurden für weitere Analysen verwendet.

Das kleinste Plasmid aus dieser ersten Serie (pBN208) war der Ausgangspunkt für eine weitere Nuklease Bal31 Verkürzung. In diesem Fall wurde das Plasmid an der singulären EcoRI Schnittstelle gespalten und mit Exonuklease behandelt. Nach der Ligation von EcoRI Linkern wurden in diesem Ansatz EcoRI/ClaI Fragmente subkloniert, wie in Abbildung 6 darge-

stellt ist. Die Subklonierung der Fragmenteschar in den Vektor pMC1403 hatte, wie auch schon im ersten Ansatz zur Folge, daß die Vektoranteile 5' der klonierten DNA-Fragmente in den verschiedenen Plasmiden absolut identisch waren.

Von 24 der nach Transformation des Ligationsansatzes erhaltenen Klonen wurden die Plasmide isoliert und die Größen der klonierten Fragmente bestimmt. Davon wurden 14 Plasmide (bezeichnet mit pBN209-pBN222) weiter charakterisiert.

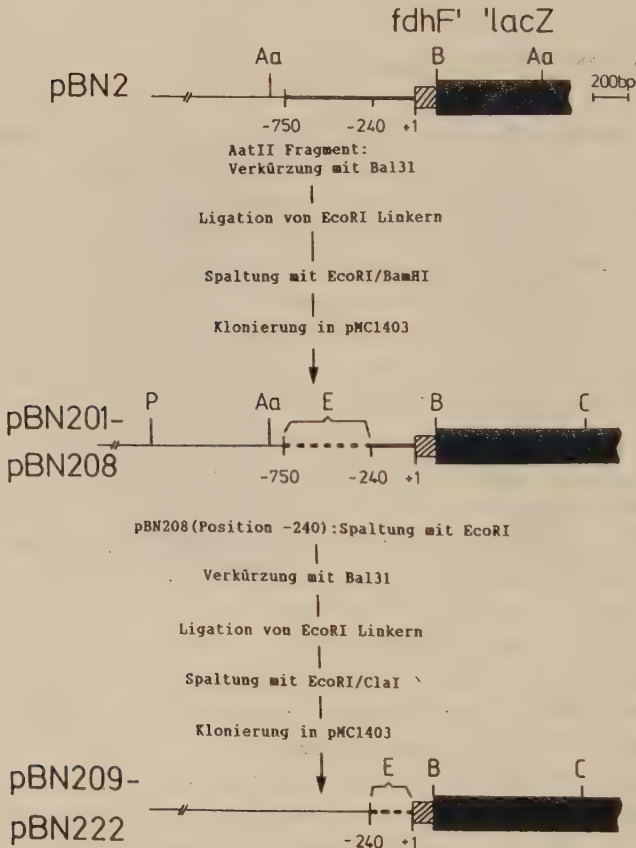


Abbildung 6:

Strategie zur Bal31-Verkürzung der *fdhF* Promotorregion.
 Starke Linien: 5' flankierende Region des *fdhF*-Gens
 Dünne Linien: Vektoranteile

2. Charakterisierung einzelner Deletionsklone

Für eine genaue Analyse der Promotorregion des fdhF Gens war es notwendig, zumindest für einen Teil der isolierten Deletionsmutanten, den Endpunkt der Deletion durch DNA-Sequenzierung festzulegen. Diese Positionen sind in Abbildung 7 in der Nukleotidsequenz der 5' flankierenden Region des fdhF-Gens (208) eingetragen. Da in den folgenden Kapiteln dieser Arbeit Positionen und Abstände immer bezogen auf den Transkriptionsstart des fdhF Gens angegeben werden, wird auch in dieser Abbildung so verfahren. (Kartierung des Transkriptionsstarts: siehe Kapitel VI.)

```

-707
GGGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGC
↑pBN2
GACGATAGTCATGCCCCGCGCCACC GGAAGGAGCTACCGGCAGCGGTGCGGACTGTTGT

AACTCAGAATAAGAAATGAGGCCGCTCATGGCGTTGGTCTGAAATTGCCGCTGTTTGACG
GTGGACGGTTGAATGCCAATCTCGAAGGCACGCGCGCCGCCAGCAACATGATGATTGAAC
GTTACAACCAAGTCAGTACTGAAACGCGGTGCGTGACGTTGCCGTCAACGGCACGCGTCTGC
-364
AAACGCTCAACGACGAGCGAGAAATGCAGGCTGAACGCGTGGAAGCCACGCGCTTTACCC
↑pBN205
AGCGCGCTGCCGAGGCCGCTATCAGCGCGGCTTAACCGCGCTTACAGGCCACCGAAG
CCCGGTTGCCAGTGCTTGCCGAAGAGATGTCATTACTGATGCTGGACAGCCGCCGGTGA
-198
TCCAAAGCATTCAGTTGATGAAATCGCTGGCGGCGGTATCAGGCAGGTCCCGTCGTCG
-142 ↑pBN208
AGAAAAATAAAATGTCTGCCGCGTGATGGCTGTCACGCGGTATTTTCGTTTCGTCACGTC
pBN210 ↑
-101 -78 -68 ↑pBN214
AAAAGTCAGCAGCAGCCTGTTTTTCGTCAGAGTTTGAATAAATAGTGCCCGTAATATCAG
↑pBN211 ↑pBN212 ↑pBN216
-45 -25 pBN213 * ↑pBN218
GGAATGACCCACATAAAATGTGGCATAAAAGATGCATACTGTAGTC G AGAGCGCGTA
↑pBN215 ↑pBN217 ↑pBN219

TGCGTGATTTGATTAACTGGAGCGAGACCG ATG AAA AAA GTC GTC ACG GTT

```

Abbildung 7:

Nukleotidsequenz der 5' flankierenden Region des fdhF-Gens (208)

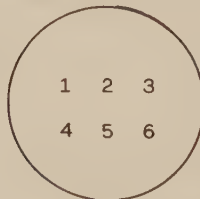
Die Pfeile bezeichnen die Endpunkte der 5' Deletionen in den verschiedenen Mutanten (Position des EcoRI Linkers). Der Stern kennzeichnet den Transkriptionsstart (Position +1).

Abbildung 8 zeigt den Phänotyp einzelner Mutanten auf MacConkey Laktose Agar. Man sieht deutlich, daß sich bereits auf diesen Platten mindestens drei Phänotypen je nach Stärke der β -Galaktosidase Expression unterscheiden lassen.



Abbildung 8:

Phänotyp verschiedener Mutanten auf MacConkey Laktose Agar.
Plasmidrezipient war *E. coli* FM911.



- 1: pBN2
- 2: pBN208
- 3: pBN210
- 4: pBN211
- 5: pBN215
- 6: pBN219

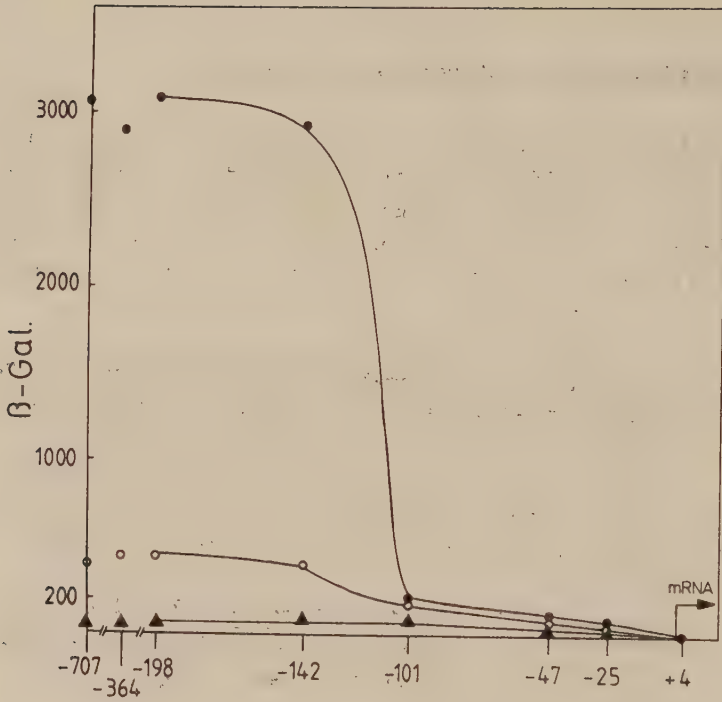
3. β -Galaktosidase Aktivität der Deletionsmutanten

Die so charakterisierten 5' Deletionsplasmide wurden in den Stamm FM911 transformiert, die Transformanten wurden unter verschiedenen Anzuchtbedingungen kultiviert und anschließend auf β -Galaktosidase Aktivität untersucht. Abbildung 9 zeigt die spezifische β -Galaktosidase Aktivität der verschiedenen Stämme. Folgende Ergebnisse lassen sich daraus ableiten:

- a) Eine Verkürzung der 5' flankierenden Region des *fdhF* Gens bis zur Position -142 hat keinen Einfluß auf die Regulation.
- b) Werden noch weitere 40 bp der 5' Region deletiert, läßt sich die Expression durch Formiat nicht mehr induzieren.
- c) Klone, die nur noch 100 oder weniger bp 5' des Transkriptionsstarts enthalten, zeigen eine niedrige Grundexpression, die unter allen getesteten Bedingungen im gleichen Größenbereich liegt.
- d) Die Phänomene "Formiatinduktion" und "Sauerstoff- oder Nitratrepression" lassen sich auf diese Weise nicht trennen und unterschiedlichen DNA-Elementen zuordnen.

Die regulatorische Region 5' des *fdhF*-Gens gliedert sich nach diesen Experimenten in drei Bereiche: eine Promotorregion, die ungefähr 40 bp 5' des Translationsstarts liegt, und ein 40 bp langes DNA-Element, das für die Formiatinduktion verantwortlich ist und durch ungefähr 100 bp vom Promotorbereich getrennt ist.

A



B

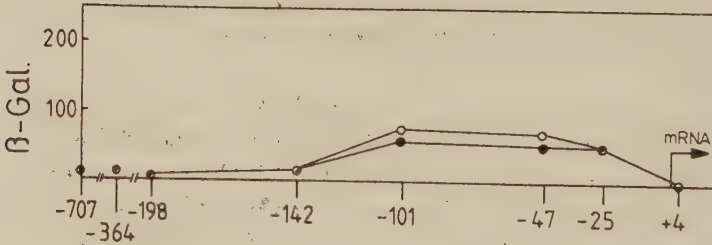


Abbildung 9:

Expression der β -Galaktosidase Aktivität in
5' Deletionsmutanten der *fdhF* Promotorregion

A: Anaerobe Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5)

B: Aerobe Anzuchten

● TGYEP + 30 mM Formiat

○ TGYEP

▲ TGYEP + 10 mM Nitrat

Die Endpunkte der Deletionen in Bezug auf den Transkriptionsstart
(Kapitel VI.) sind auf der Abszisse angegeben.

IV. Einfluß verschiedener Mutationen auf die Expression von $fdhF'$ - $'lacZ$

1. Analyse von fnr Mutanten

Als nächstes wurde der Einfluß einer fnr Mutation auf die Expression von $fdhF'$ - $'lacZ$ anhand eines isogenen fnr^+/fnr^- Stammpaars untersucht. In Abbildung 10 ist diese Konstruktion dieses Stammpaars schematisch dargestellt. Ein fnr Wildtyp-Allel aus *E. coli* MC4100 wurde dabei mittels P_1 -Transduktion in die fnr Mutante FM56 übertragen, wobei auf Fähigkeit zu anaerobem Wachstum auf Glycerin-/Nitrat-Medium selektiert wurde.

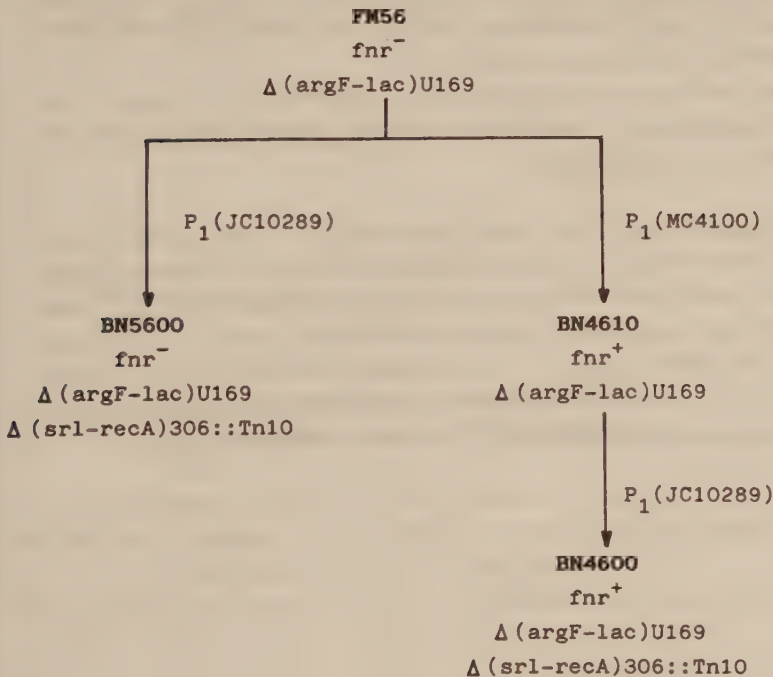


Abbildung 10:

Konstruktion isogener fnr^+/fnr^- Stämme; P_1 (MC4100): Transduktion mit P_1 -Lysat des Stammes MC4100

Eine Reihe der in Kapitel III beschriebenen 5' Deletionsplasmide wurde in die beiden Stämme BN5600 (fnr^-) und BN4600 (fnr^+) transformiert. Das Histogramm in Abbildung 11 zeigt die β -Galaktosidase Aktivität der verschiedenen Stämme nach Anzucht unter anaeroben Bedingungen.

Man sieht, daß in Anwesenheit von Formiat im Kulturmedium beide Stämme (fnr^+/fnr^-) mit den Plasmiden pBN2, pBN210 identische β -Galaktosidase Aktivitäten aufweisen. Ohne Formiat gezogen, sind die Aktivitäten im fnr^- Stamm geringer als im fnr^+ Stamm, was sehr gut mit dem Einfluß von FNR auf die Regulation der Pyruvatformiatlyase zu erklären ist (163), da intrazellulär eine geringere Menge des Induktors Formiat gebildet wird.

Ebenso wie im Wildtyp läßt sich der $fdhF$ Promotor im Plasmid pBN211 auch in der fnr Mutante nicht mehr durch Formiat induzieren (vergleiche auch Abbildung 9).

Expression der $fdhF'$ - $'lacZ$ Fusionen wird auch in einer fnr Mutante durch Nitrat (anaerob) und durch Sauerstoff reprimiert (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß durch diese Analysen kein direkter Effekt von FNR auf die Transkriptionsregulation des $fdhF$ Gens nachgewiesen werden konnte. Der gleiche Befund ergab sich auch aus Studien eines für die Expression der Hydrogenase 3 notwendigen Gens ($hyd-17$) (nicht gezeigt) (25). Die Synthese der beiden Gärungsenzyme Formiatdehydrogenase und Hydrogenase 3 ist also FNR-unabhängig.

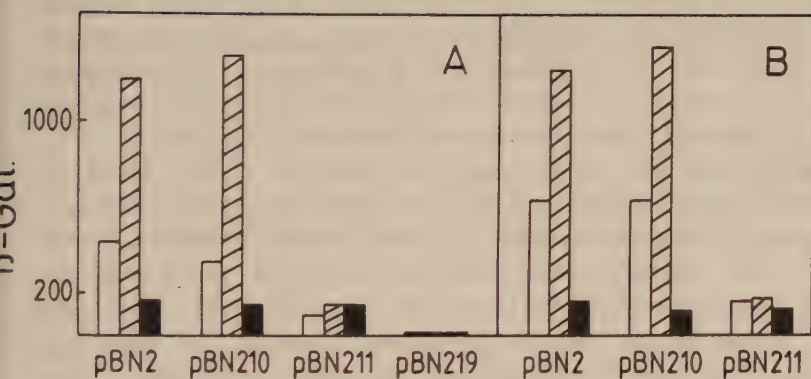


Abbildung 11:
Effekt einer *fnr* Mutation auf die Expression
von *fdhF'*-*'lacZ*

A: Plasmidrezipient BN5600 (*fnr*⁻)

B: Plasmidrezipient BN4600 (*fnr*⁺)

Anzuchten anaerob in TGYEP-Medium (pH 6,5)

weiße Balken: -Formiat; schraffierte Balken: +30 mM Formiat;

schwarze Balken: +10 mM Nitrat

β-Gal: Einheiten spezifischer β-Galaktosidase Aktivität

2. Analyse einer FDH_N Mutante

Eine mögliche Ursache für die Repression von $fdhF$ unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Nitrat könnte auf der Titration des obligaten Induktors Formiat durch einen aktiven FDH_N /Nitratreduktase Enzymkomplex beruhen (15, 209). Es konnte allerdings bereits im Rahmen der Diplomarbeit (23) gezeigt werden, daß sich die Repression durch Nitrat durch steigende Mengen an Formiat nicht vollständig aufheben läßt (25).

Die Isolierung der FDH_N negativen Mutante WL318 durch W. Leinfelder (109) ermöglichte es, die $fdhF$ Expression und speziell deren Nitratrepression in einem solchen Stamm zu untersuchen. Die entsprechende Mutation liegt in WL318 nach V. Stewart (persönliche Mitteilung) in den Genorten $fdhD$ oder $fdhE$. Diese beiden Genorte waren von Haddock und Mandrand-Berthelot (74) bereits beschrieben und kartiert worden. Ähnliche Mutanten (fdn) wurden auch von *Salmonella typhimurium* isoliert (141).

Tabelle 7 zeigt die Expression von $fdhF'$ - $'lacZ$ in der Mutante WL318.

Tabelle 7: Expression von $fdhF'$ - $'lacZ$ in einer FDH_N Mutante

Stamm	relevanter Genotyp	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)	
		Glukose ^a	Glukose
		(anaerob)	10 mM Nitrat (anaerob)
FM420/pBN2	$fdhF^+$	340	20
WL318/pBN2	$fdh-8$	405	142

a: Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5)

Nach diesen Ergebnissen erfolgt die Repression durch Nitrat in einer FDH_N Mutante nicht mehr gleich strikt wie im Wildtyp (FM420). Da aber fdhF Expression dennoch eindeutig durch Nitrat verringert wird, scheidet der Verbrauch des Induktors Formiat durch die Aktivität des FDH_N /Nitratreduktase Komplexes als alleinige Ursache für die Nitratrepression (nach dem oben beschriebenen Modell) aus.

V. Konstruktion und Analyse einer fdhF'-Tet Operonfusion

Wie in Abbildung 9 (Kapitel III) gezeigt werden konnte, enthält das Plasmid pBN208 mit 240 bp der 5' flankierenden Region des fdhF Gens die gesamte Sequenzinformation, die für die Regulation des fdhF Gens erforderlich ist. Durch die Konstruktion einer Operonfusion zwischen dem Tetrazyklin-Resistenzgen und dieser regulatorischen Region des fdhF Gens sollte nun geprüft werden, ob sich auch die Synthese eines anderen Genprodukts über die fdhF Kontrollregion steuern läßt.

Abbildung 12 zeigt schematisch das konstruierte Plasmid pBN80, das eine fdhF'-Tet Operonfusion trägt. Das 1,1 kb PstI/BamHI Fragment aus dem Plasmid pBN208 (siehe Abbildung 6) wurde dazu in den Vektor pGA46 (BglIII/PstI Fragment) inseriert (6). Dieser Vektor enthält ein promotorloses Tetrazyklin-Resistenzgen, jedoch noch dessen homologes Translationsinitiationssignal. Das rekombinante Plasmid pBN80 sollte demnach Tetrazyklinresistenz unter der Kontrolle des fdhF Promotors vermitteln. Nach Transformation in den Stamm E. coli FM420 wurde gefunden, daß Zellen mit dem Plasmid pBN80 (im Gegensatz zur Kontrolle mit pGA46) unter anaeroben Bedingungen mit Formiat bis zu einer Tetrazyklinkonzentration von 2,5 µg/ml wuchsen. Dagegen war das Wachstum unter aeroben Bedingungen und unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat bereits bei einer Tetrazyklinkonzentration von 1 µg/ml gehemmt.

Im Anschluß daran konnte auch von V. Schlensog mit Hilfe von fdhF'-Cm Operonfusionen eindeutig gezeigt werden, daß die fdhF Kontrollregion in der Lage ist, die Expression von Fremdgenen zu steuern (168).

siehe folgend Abbildung 12

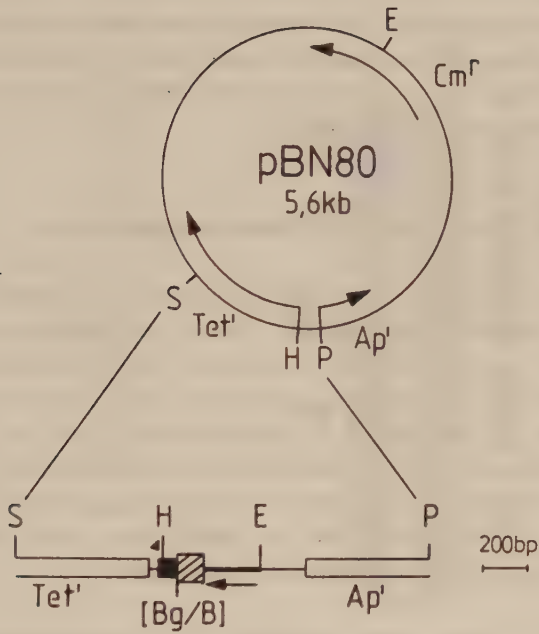


Abbildung 12:

Restriktionskarte des Plasmids pBN80

-  Antibiotikaresistenzgene
-  N-Terminus von fdhF, fusioniert mit Vektoranteil
-  Translationsstopp (TAA-Kodon)
-  fdhF 5' flankierende Region

VI. Analyse des *fdhF* Promotors

Die 5' flankierende Region des *fdhF* Gens (siehe Abbildung 7) enthält keinen für *Escherichia coli* typischen -10/-35 Promotor (80). Die Identifizierung der Promotorsequenz und des Transkriptionsstartpunktes dieses anaerob regulierten Gens stellte daher eine wichtig Frage dar, die durch Bestimmung des Startpunkts der Transkription angegangen wurde.

1. Nuklease S1 Kartierung des Transkriptionsstarts

Stamm MC4100 von *E. coli* wurde dazu unter anaeroben Bedingungen in TGYEP-Medium (pH 6,5) mit 30 mM Formiat bis zu einer OD₄₂₀ von 1 angezogen. Anschließend wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und bei verschiedenen Temperaturen mit dem am 5' Ende des kodierenden Stranges markierten 870 bp *SmaI*/*Asp718* Fragment aus pFM3 (siehe Abbildung 1) hybridisiert. Nach Nuklease S1 Behandlung wurden die geschützten DNA/RNA Hybride neben den Sequenzproben des 5' markierten *SmaI*/*Asp718* Fragments in einem 8 % Sequenzgel aufgetrennt.

Abbildung 13 zeigt einen Ausschnitt aus dem Sequenzautoradiogramm, das zwei DNA/RNA Hybride (Unterschied 1 bp) auflöst. Weaver und Weissmann konnten zeigen, daß das Enzym Nuklease S1 den überhängenden DNA Strang häufig nicht exakt bis zum DNA/RNA Hybrid abbaut und es deshalb zu verschiedenen DNA/RNA Hybriden mit geringen Größenunterschieden kommen kann (197). Deshalb wurde das kürzere Hybrid als spezifisch für den Transkriptionsstart angesehen. Nach der Korrektur um 1,5 Nukleotide (180) konnte der Guanin-Rest an Position -41, bezogen auf den Translationsstart, als Startpunkt der Transkription angegeben werden. Dieses Ergebnis konnte durch Hybridisierung der RNA mit einer anderen *fdhF* spezifischen DNA-Sonde bestätigt werden (Ergebnis nicht gezeigt).

siehe folgend Abbildung 13

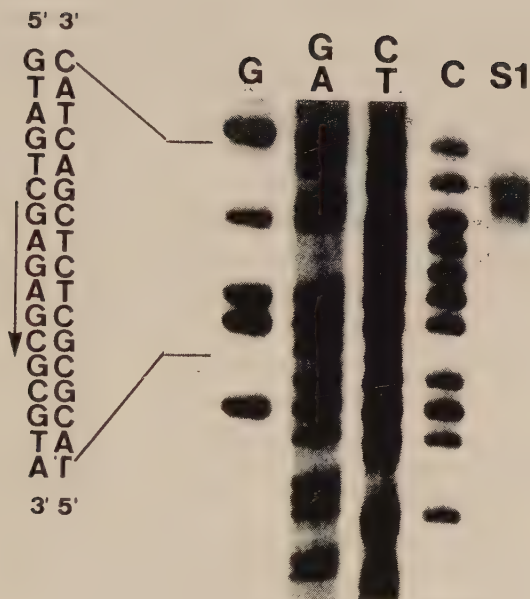


Abbildung 13:

Nuklease S1 Kartierung des Transkriptionsstarts

Spuren 1-4: Sequenzreaktionen des 5' markierten
SmaI/Asp718 Fragments aus pFM3

Spur 5: DNA / RNA Hybride nach Nuklease S1-
Behandlung

Das gleiche Experiment wurde auch mit RNA durchgeführt, die aus aerob angezogenen Zellen präpariert worden war. In diesem Fall konnte kein Transkript nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Eine Analyse der Nukleotidsequenz unmittelbar 5' zum Transkriptionsstartpunkt ergab einen überraschenden Befund. Es konnten nämlich Promotorkonsensus-Motive identifiziert werden, die bis zum damaligen Zeitpunkt als "nif"- beziehungsweise "ntr"-spezifisch beschrieben worden waren (4, 7, 73). Die charakteristischen Sequenzmotive befinden sich bei diesem Promotortyp um die Positionen -12 und -24, bezogen auf den Transkriptionsstart, und sind exakt 10 Basenpaare voneinander getrennt (Tabelle 8). Der gleiche "nif-Konsensus-Promotor" konnte danach auch in dem Promotorbereich eines für die Hydrogenase 3 Expression notwendigen Gens (27) lokalisiert werden (hyd).

Tabelle 8: Vergleich verschiedener -12/-24 Promotoren ("nif-Typ")

Gen	Promotorsequenz						Referenz
		-24			-12		
nifH _K	CT	GG	TATGTTCCCT	GC	A		(177)
nifU _K	CT	GG	TATCGCAATT	GC	T		(22)
nifB _K	CT	GG	TACAGCATTT	GC	A		(22)
glnAp2 _E	TT	GG	CACAGATTTC	GC	T		(150)
fdhF _E	GT	GG	CATAAAAGAT	GC	A		(A)
hyd _E	TT	GG	CACAAAAAAT	GC	T		(27)
"nif-Konsensus" _{K,R,B}	CT	GG	PAPPNNNTT	GC	A		(4,7,73)
			Y Y U				

Indizes: K: *Klebsiella pneumoniae*; E: *Escherichia coli*; R: *Rhizobium* sp.;
B: *Bradyrhizobium* sp.

A: diese Arbeit

2. Einfluß von Mutationen im -12 Konsensus Motiv des fdhF Promotors auf die Expression von fdhF'-lacZ

Um die biologische Bedeutung der konservierten "nif-Promotorelemente" in der fdhF Promotorregion zu untersuchen, wurden einige verschiedene Insertions- und Deletionsmutanten mit verändertem Promotorbereich konstruiert und analysiert. Das Vorkommen einer NsiI Spaltstelle in dem -12 Promotormotiv ermöglichte das gezielte Einführen von Mutationen in dieses Strukturelement.

Abbildung 14 faßt die Konstruktion der verschiedenen Plasmide schematisch zusammen. Im Plasmid pBN280 wurden nach Spaltung mit NsiI die 3' überhängenden DNA-Enden mit Mung Bean Nuklease abgebaut und anschließend die glatten DNA-Enden religiert. Dieses Vorgehen führte zu einer Deletion von vier Basenpaaren, die das GC-Motiv an Position -12 mit einschloß.

In den Plasmiden pBN208 Ω und pBN208 $\Delta\Omega$ wurden Insertionen in das -12 Motiv eingeführt. Im ersten Fall (pBN208 Ω) wurde ein 2 kb großes Ω -Fragment in die NsiI Spaltstelle von pBN208 inseriert. Das Ω -Element kodiert für eine Streptomycin- und eine Spektinomycinresistenz und enthält an beiden Enden starke Transkriptions- und Translationsterminatoren (147). Im zweiten Fall (pBN208 $\Delta\Omega$) wurden durch die Deletion des Ω -Elements in Plasmid pBN208 Ω netto zehn Basenpaare (1 BamHI-Linker) in die NsiI Stelle des Plasmids pBN208 inseriert.

Die isolierten Insertions- und Deletionsplasmide wurden durch DNA Sequenzierung (nach der enzymatischen Methode) überprüft. In der Tabelle 9 sind die relevanten Ausschnitte aus der Nukleotidsequenz der Promotormutanten, verglichen mit der Wildtypsequenz, dargestellt.

Die Plasmide wurden in den Stamm E. coli FM911 transformiert und anschließend wurde die β -Galaktosidase Aktivität der Transformanten bestimmt (Tabelle 10).

siehe folgend Abbildung 14 und Tabellen 9 und 10

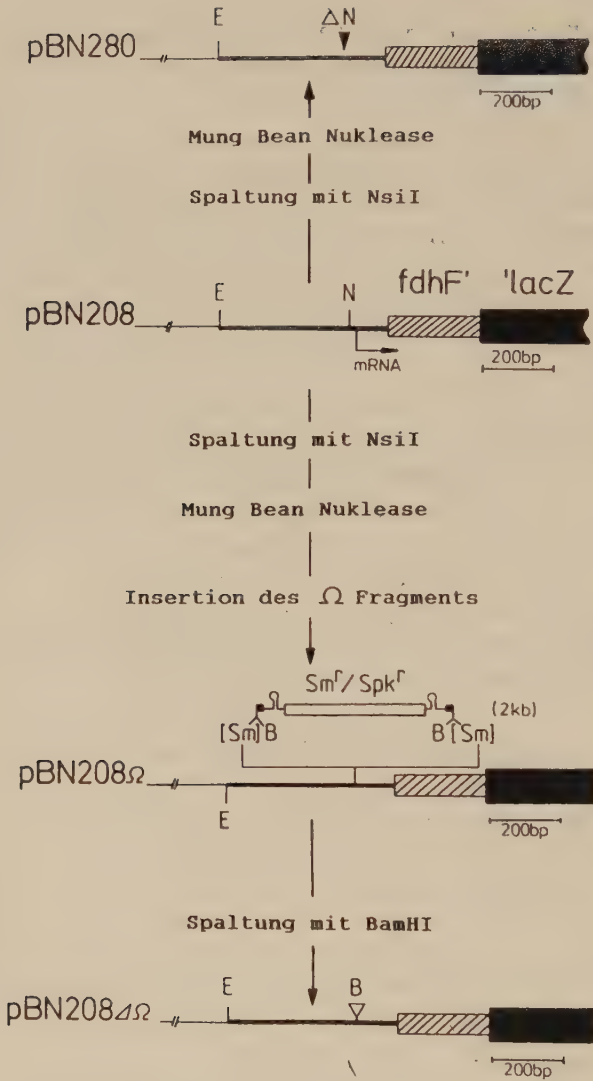


Abbildung 14:

Konstruktion von Plasmiden mit Insertionen und Deletionen im -12 Konsensusmotiv

Ω Transkriptionstermination, ■ Translationstermination
 [Sm] glatte Enden des Ω -Fragments nach SmaI-Spaltung von pHP45 Ω (147)

Tabelle 9: Nukleotidsequenz der verschiedenen Promotormutanten

Plasmid	Promotorsequenz					
		-24		-12		+1
pBN208 (Wildtyp)	AATGT	GG	CATAAAAGAT	GC		ATACTGTAGTCGAGAG
pBN280	AATGT	GG	CATAAAAGA-	--		-TACTGTAGTCGAGAG
pBN208 Ω	AATGT	GG	CATAAAA			ACTGTAGTCGAGAG
pBN208 $\Delta\Omega$	AATGT	GG	CATAAAAGGGG	AT	CCCC	ACTGTAGTCGAGAG

Position +1: Transkriptionsstart

Unterstrichene Sequenz: NsiI Schnittstelle im Wildtyppromotor

Tabelle 10: Einfluß von Mutationen im -12 Konsensus Motiv des Promotors auf die Expression von fdhF'-lacZ

Plasmid ^a	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)		
	Glukose ^b	Glukose	Glukose
		30 mM Formiat	10 mM Nitrat
pBN208	320	2 770	86
pBN280	150	354	84
pBN208 Ω	<1	< 1	< 1
pBN208 $\Delta\Omega$	2	2	< 1

a: Rezipient für die verschiedenen Plasmide war E. coli FM911.

b: Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5) unter anaeroben Bedingungen.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, daß in den Plasmiden pBN280, pBN208 Ω , pBN208 $\Delta\Omega$ ein essentielles Promotorelement zerstört wurde. Die Insertion des 2 kb-Elements (pBN208 Ω) und die Insertion des GC-reichen BamHI-Linkers in das -12 Konsensusmotiv bewirken gleichermaßen den völligen Verlust der fdhF'-lacZ Expression.

In der Deletionsmutante pBN280 läßt sich der Promotor dagegen noch eindeutig durch Formiat induzieren und man erhält ungefähr 10 % der für den Wildtyp charakteristischen Expression. In diesem Plasmid wird zufällig durch die Deletion von 4 bp ein AC-Paar in 10 bp Abstand 3' des -24 Konsensusmotivs positioniert (siehe Tabelle 9).

Eine bereits untersuchte Promotorvariante des nifH Promotors aus Klebsiella pneumoniae mit einem AC-Paar an der -12 Position kann ebenfalls noch in geringem Umfang aktiviert werden (31). Möglicherweise wird auch in der fdhF Promotorvariante pBN280 das oben angegebene AC-Paar als "schlechtes -12 Konsensusmotiv" von der RNA Polymerase erkannt und es kommt zu einer geringen Promotor Aktivität.

3. Einfluß einer ntrA-Mutation auf die Expression von fdhF'-lacZ

Die im letzten Abschnitt charakterisierten Promotormutanten liefern einen Hinweis dafür, daß die Transkription des fdhF Gens von einem funktionellen -12/-24 Promotor gesteuert wird. Promotoren von diesem Typ weisen neben den konservierten Primärstrukturelementen an den Positionen -12 und -24 noch eine weitere Besonderheit auf: die Abhängigkeit der Expression von dem ntrA-Genprodukt. Das NTRA Protein ist ein spezieller Sigmafaktor, der die Erkennungsspezifität der RNA Polymerase verändert (82, 85).

Für die Analyse der fdhF-Expression in ntrA Mutanten wurden im Lauf dieser Arbeit verschiedene Mutanten mit gleichem genetischen Hintergrund (MC4100) verwendet. Den Stammbaum dieser Mutanten zeigt die Abbildung 15.

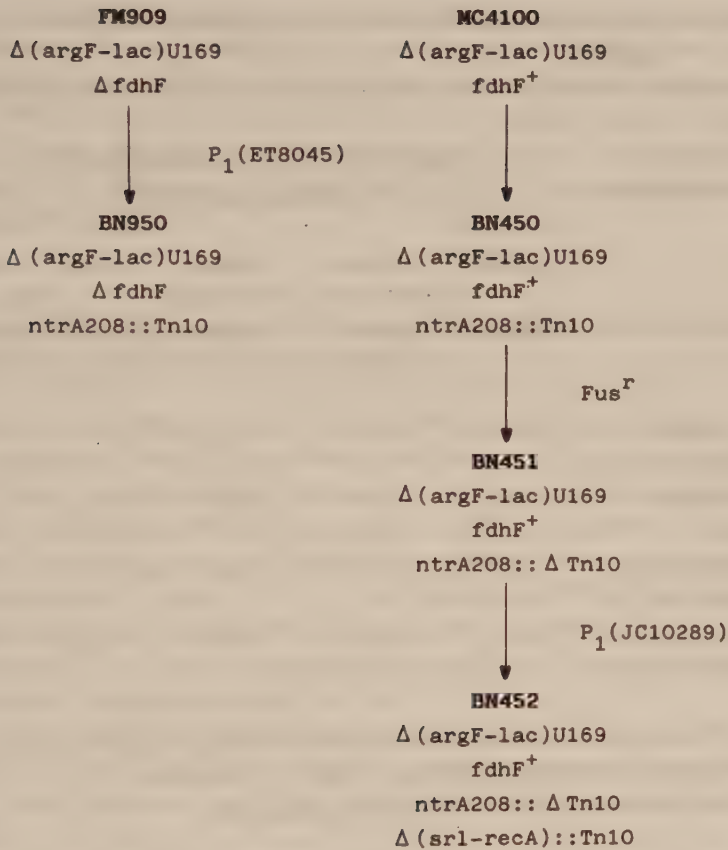


Abbildung 15:

Stammbaum der verwendeten *ntrA* Mutanten

P_1 (ET8045): P_1 Transduktion mit P_1 -Lysat des Stammes ET8045;
 Fus^R : Fusarsäure resistent.

Die Expression von *fdhF'*-*'lacZ* (Plasmid pBN208) wurde vergleichend in den Stämmen BN950 (*ntrA*⁻) und FM909 (*ntrA*⁺) untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11: Effekt einer ntrA-Mutation auf die Expression von fdhF'-lacZ (pBN208)

Stamm (relevanter Genotyp)	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)				
	Glukose ^a (anaerob)	Glukose 30mM Formiat (anaerob)	Glukose 10mM Nitrat (anaerob)	Glukose (aerob)	Glukose 30mM Formiat (aerob)
FM909 (pBN208) ntrA ⁺	340	1 310	115	60	72
BN950 (pBN208) ntrA ⁻	235	380	130	52	60
BN950(pBN208;pBN17) ntrA ⁻ (ntrA _K ⁺)	125	710	30	n.b.	n.b.
BN950(pBN208;pBN18) ntrA ⁻ (ntrA _K ⁺)	220	1 075	85	n.b.	n.b.

a: Anzuchten in TGYE-~~Medium~~ (pH 6,5) mit 0,2 % Glutamin

n.b.: nicht bestimmt; Index K: Klebsiella pneumoniae

Das ntrA-Genprodukt hat eindeutig einen positiven Einfluß auf die Expression von fdhF'-lacZ, da unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Formiat die β -Galaktosidase Aktivität in der ntrA-Mutante um 70 % reduziert ist. Dagegen ist die Repression unter aeroben Bedingungen und unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat auch in der ntrA-Mutante unverändert zu beobachten. Die Expression der fdhF'-lacZ Fusion ist in der ntrA-Mutante aber dennoch unerwartet hoch und auch durch Formiat nicht induzierbar. Möglicherweise ist dieses Phänomen eine Folge des plasmidkodierten Testsystems. Ein ähnlicher Effekt wurde von L.J. Reitzer und B. Magasanik auch für den glnA-Promotor beschrieben (151).

Die vollständige Abhängigkeit der FDH_H Expression von der Anwesenheit eines intakten *ntrA*-Genprodukts konnte mit der physiologischen Charakterisierung der Mutante BN450 (Abbildung 15) zweifelsfrei gezeigt werden. Zum einen bildet diese Mutante kein Gas und zum anderen konnte von G. Sawers keine Formiatdehydrogenase (H) Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden (24).

Komplementierung der *ntrA*-Mutation in *E. coli* mit dem klonierten *ntrA*-Gen aus *Klebsiella pneumoniae*

Die Rolle des NTRA Proteins als essentieller Sigmafaktor für die Erkennung von -12/-24 Promotoren durch die RNA Polymerase wurde auch in *Klebsiella pneumoniae* (126), *Azotobacter vinelandii* (128) und *Rhizobium meliloti* (153) eingehend untersucht. Das *ntrA_K*-Gen aus *Klebsiella pneumoniae* wurde kloniert und sequenziert (126, 129). Von Merrick und Stewart konnte gezeigt werden, daß das NTRA Protein aus *K. pneumoniae* auch in *Escherichia coli* die Transkription des *nifL*-Promotors aus *K. pneumoniae* stimulieren kann (129).

In der vorliegenden Arbeit stellte sich daher die interessante Frage, ob das NTRA Protein aus *K. pneumoniae* auch den Effekt einer *ntrA*-Mutation auf die *fdhF'*-*'lacZ* Expression aufheben kann.

Das von Merrick und Stewart isolierte rekombinante Plasmid pMM17 enthält das *ntrA_K*-Gen aus *K. pneumoniae* auf einem *Cla*I Fragment, kloniert in den Vektor pBR327 (129). Da die *fdhF'*-*'lacZ* Fusionsplasmide als Derivate von pMC1403 ebenfalls auf einem pBR322 Replikon basieren, mußte das *ntrA_K*-Gen in ein kompatibles Plasmid umklontiert werden. Das 1,9 kb *Cla*I Fragment aus pMM17 wurde deshalb in beiden Orientierungen in den Vektor pACYC184 (39) kloniert. Die rekombinanten Plasmide erhielten die Bezeichnungen pBN17 und pBN18. Den Einfluß des heterologen *ntrA_K*-Genprodukts auf die Expression von *fdhF'*-*'lacZ* in einer *E. coli* *ntrA*-Mutante zeigt Tabelle 11.

Die Ergebnisse dieser Experimente demonstrieren, daß auch das NTRA Protein aus *K. pneumoniae* die Transkription des *fdhF'*-

Promotors aktivieren kann. Die *fdhF'*-*'lacZ* Expression erreicht aber mit dem heterologen *ntrA*-Genprodukt nie den Vergleichswert des Wildtypstammes FM909 und ist auch mit den beiden Plasmiden pBN17 und pBN18 signifikant unterschiedlich. Sehr wahrscheinlich wird die Transkription des *ntrA_K*-Gens in dem Plasmid pBN18 durch den plasmidkodierten Anti-Tet-Promotor (191) positiv beeinflusst, und es kommt zu einer zusätzlichen Erhöhung der Menge an *ntrA_K*-Genprodukt. Ähnliche Effekte durch Plasmidpromotoren sind bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden (16, 29, 58).

Eine wesentliche Aussage ist aber, daß das *ntrA_K*-Gen aus *K. pneumoniae* auch in erhöhter Genkopienzahl den Effekt einer *ntrA*-Mutation auf die *fdhF'*-*'lacZ* Expression in *E. coli* nicht völlig aufheben kann.

Im folgenden wurde nun untersucht, ob auch ein anderer -12/-24 Promotor in *Escherichia coli* durch das heterologe *ntrA_K*-Genprodukt nur teilaktiviert wird.

Einer der beiden Promotoren (*glnAp2*) des Glutaminsynthetase-operons *glnALG* ist in seiner Aktivität NTRA-abhängig (150). Daher wurde der Effekt des klonierten *K. pneumoniae* NTRA Sigmafaktors auf die Glutaminsynthetase-Aktivität in der *E. coli* Mutante BN450 untersucht (Tabelle 12).

Der Stamm BN450 mit den Plasmiden pBN17 oder pBN18 hat nur 12 % beziehungsweise 15 % der Glutaminsynthetase-Aktivität des Wildtypstammes MC4100. Dieses Ergebnis bestätigt also die oben in Zusammenhang mit dem *fdhF* Promotor diskutierten Daten und läßt vermuten, daß das *ntrA_K*-Genprodukt aus *K. pneumoniae* nur ungenügend mit dem *E. coli* Transkriptionsapparat kooperieren kann und es auf diese Weise nur zu einer Teilaktivierung von *E. coli* -12/-24 Promotoren kommen kann.

Tabelle 12: Glutaminsynthetase Aktivität in $\text{ntrA}^+/\text{ntrA}^-$ Stämmen

Stamm (relevanter Genotyp)		Spezifische Glutaminsynthetase Aktivität ^b	
		Glukose ^a 0,2 % Glutamin	Glukose 0,2 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
MC4100	ntrA^+	1,8	0,17
BN450	ntrA^-	0,025	0,02
BN450 (pBN17)	$\text{ntrA}^-(\text{ntrA}_K^+)$	0,21	0,075
BN450 (pBN18)	$\text{ntrA}^-(\text{ntrA}_K^+)$	0,27	0,16

a: Anzuchten im W-Minimalmedium (aerob)

b: Angabe der Aktivitäten in μmol gebildetes γ -Glutamylhydroxamat/min x mg Protein

Die unter Abschnitt VI erzielten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Der Transkriptionsstartpunkt des *fdhF* Gens liegt 41 Basen-paare 5' des Translationsstarts.
- fdhF*-spezifische Transkripte lassen sich nur nach anaerober Anzucht nachweisen.
- Das *fdhF* Gen besitzt einen -12/-24 ("nif") Promotor.
- Die Transkription des *fdhF* Gens ist abhängig von dem *ntrA*-Genprodukt.

VII. Klonierung und Expression des ntrA-Gens aus *Escherichia coli*

Die Abhängigkeit der fdhF Transkription vom ntrA-Genprodukt (σ^{54}) wurde im letzten Kapitel ausführlich dargestellt. Demnach kann das klonierte ntrA-Gen aus *K. pneumoniae* eine *E. coli* ntrA-Mutante nur zum Teil komplementieren und demzufolge auch die fdhF'-lacZ Expression nur partiell aktivieren. Mit Hilfe des klonierten ntrA-Strukturgens aus *E. coli* sollte daher im folgenden überprüft werden, ob damit in der ntrA-Mutante Wildtyp-Expression von fdhF'-lacZ erreicht oder ob durch die Erhöhung der ntrA-Gendosis vielleicht sogar eine Steigerung der fdhF Expression erzielt werden kann.

1. Klonierung des ntrA-Gens aus *Escherichia coli*

Wie in Kapitel VI. bereits beschrieben, haben ntrA-Mutanten einen pleiotropen Phänotyp. Sie sind unter anderem Glutamin auxotroph (Gln^-) (65, 66) und Formiatdehydrogenase (H) negativ. Infolge der fehlenden FDH_H Enzymaktivität können diese Mutanten nach anaerober Anzucht kein Gas bilden und auch kein Benzylviologen reduzieren. Diese Eigenschaft konnte als Grundlage für die Identifizierung von ntrA-positiven Transformanten nach Klonierungen verwendet werden, da sich solche Klone nach Überschichtung mit einem Benzylviologen-haltigen Weichagar dunkelviolet anfarbten (Reduktion von Benzylviologen).

Für die Klonierung von ntrA wurde von W. Leinfelder freundlicherweise eine Cosmidbank zur Verfügung gestellt. Die Cosmidbank enthielt Sau3A-Fragmente chromosomaler DNA des Wildtyps MC4100, kloniert in den Vektor pHC79 (109).

Der Stamm *E. coli* BN451 (ntrA^-) (siehe Abbildung 15) wurde nach Anzucht in YM-Medium mit 0,2 % Glutamin und 0,2 % Maltose mit der Cosmidbank infiziert. Ampicillinresistente Transformanten wurden nach 18 Stunden anaerober Bebrütung auf TGYEP-Platten mit 0,2 % Glutamin erhalten. Diese wurden sofort nach

der Entnahme der Platten aus dem Anaerobentopf mit Benzylviologen-haltigem Weichagar überschichtet. Von den auf diese Weise getesteten 750 cosmidhaltigen Transformanten zeigten zwei stark positive Benzylviologen (BV)-Reduktion. Diese beiden Klone wurden anschließend physiologisch näher charakterisiert. So konnte für beide Klone Gasbildung im Durhamröhrchen (wie im Wildtypstamm) und Verlust der Glutaminauxotrophie nachgewiesen werden. Beide cosmidhaltigen Transformanten waren also phänotypisch ntrA-positiv.

Aus einem der Klone wurde das rekombinante Cosmid isoliert. Die DNA wurde im Anschluß daran mit Sau3A in 3 bis 5 kb große Fragmente gespalten und diese wurden in die BamHI-Stelle des Vektors pACYC184 inseriert. Nach Transformation des Ligationansatzes in den Stamm E. coli BN452 (ntrA⁻) (siehe Abbildung 15) wurden, wie oben beschrieben, ntrA-positive Subklone durch BV-Reduktion identifiziert. Von 600 getesteten Transformanten erwiesen sich fünf Klone als ntrA-positiv. Aus diesen fünf Subklonen wurden die rekombinanten Plasmide isoliert und durch Restriktionskartierung analysiert.

Die Abbildung 16 zeigt die Restriktionskarte des kleinsten Plasmids pBN61. Das ntrA-Gen liegt demnach auf einem 2,7 kb großen Fragment chromosomaler DNA des Stammes MC4100.

2. Expressionsanalyse des plasmidkodierten ntrA-Gens

Das T7 RNA Polymerase/Promotor System bietet eine sehr gute Möglichkeit zur Überexpression und selektiven Markierung plasmidkodierter Proteine (192). Das Expressionssystem wurde im Lauf dieser Arbeit dazu verwendet, die Transkriptionsrichtung des ntrA-Gens auf dem 2,7 kb großen, klonierten Fragment in pBN61 festzulegen.

Das NheI/NruI Fragment aus pBN61 (Abbildung 16) wurde in beiden Orientierungen 3' des plasmidkodierten (pT7-5, pT7-6) T7-Promotors ϕ 10 kloniert.

siehe folgend Abbildung 16

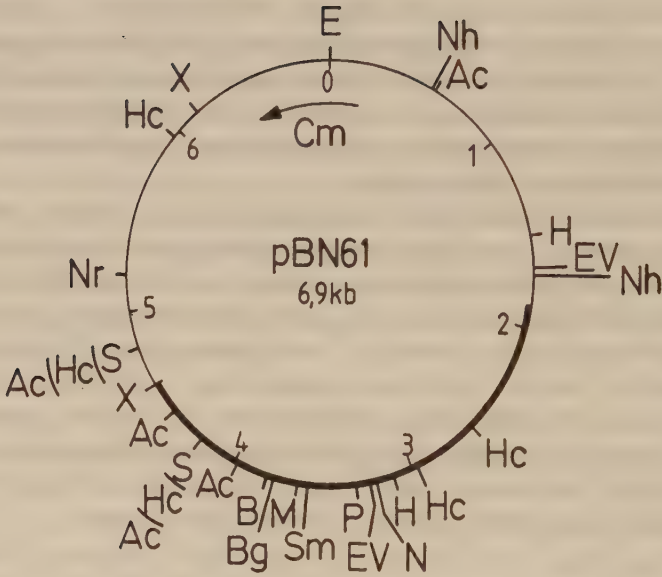


Abbildung 16:

Restriktionskarte des Plasmids pBN61

Dünne Linie: Anteil des Vektors pACYC184

Starke Linie: kloniertes 2,7 kb Fragment

Folgende Restriktionsenzyme spalten das klonierte
Fragment nicht:

EcoRI, PvuII, KpnI, SacI, XhoI, BglI, XbaI, SphI, ClaI,
NheI, NruI, SpeI

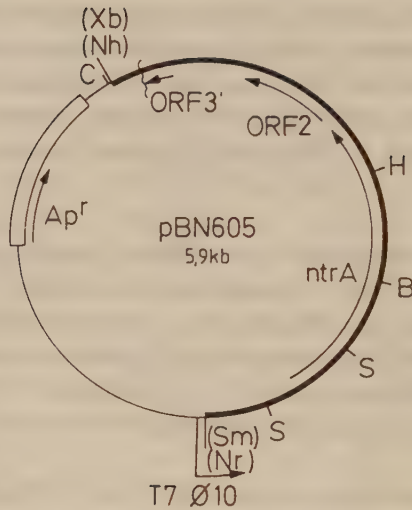
Die mit pBN605 und pBN606 bezeichneten rekombinanten Plasmide (Abbildung 17) wurden in den Stamm K38 transformiert. Dieser Stamm enthält das Gen für die RNA Polymerase des Bakteriophagen T7 unter der Kontrolle des starken Lambda Promotors P_L , kloniert auf einem zu den pT7 Vektoren kompatiblen Plasmid (pGP1-2).

Nach Anzucht von K38/pGP1-2 mit pBN605 beziehungsweise pBN606 und Hitzeinduktion der (Rifampicin-resistenten) T7 Polymerase wurden nach Zugabe von Rifampicin (zur Blockierung der zell-eigenen E. coli RNA Polymerase) die translatierten Proteine in vivo mit ^{35}S -Methionin markiert. Abbildung 18 zeigt die Autoradiogramme verschiedener Markierungsexperimente.

Nach diesen Ergebnissen wurden im Stamm K38/pGP1-2; pBN605 drei Genprodukte mit 72 kDa, 15 bis 20 kDa und 3 bis 5 kDa selektiv markiert (Abbildung 18B). Die Transkriptionsrichtung der betreffenden Gene konnte daher, wie in Abbildung 17 gezeichnet, angegeben werden. Bei dem 72 kDa Protein handelt es sich um das ntrA-Genprodukt (σ^{54}). Alle Sigmafaktoren sind extrem saure Proteine und zeigen daher ein abnormes Laufverhalten in SDS-Polyacrylamidgelen (34, 67). So täuscht auch das ntrA-Genprodukt aus K. pneumoniae mit einer Größe von 54 kDa nach dem Laufverhalten in SDS-Polyacrylamidgelen ein höheres Molekulargewicht vor (75 - 76 kDa) (126).

Abbildung 18A zeigt ein Kontrollexperiment mit dem Stamm K38/pGP1-2; pT7-3. Die Spur 1 zeigt die nur in Anwesenheit von Rifampicin spezifisch markierten, vektorkodierten (pT7-3) bla-Genprodukte mit 31 und 29 kDa.

A



B

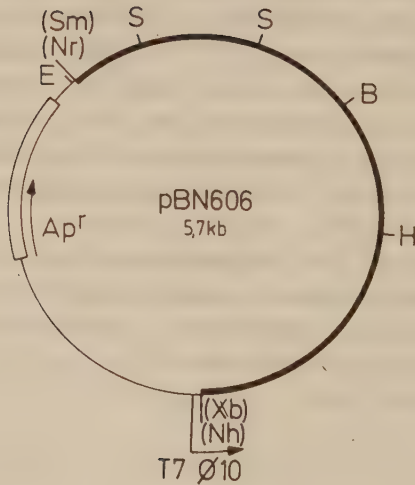


Abbildung 17:

Restriktionskarten der Plasmide pBN605 und pBN606

Dünne Linie: Anteile der Vektoren pT7-5 (A) bzw. pT7-6 (B)
Starke Linie: NheI/NruI Fragment aus pBN61 (Abb. 16)

T7 Ø10

Transkriptionsstart der T7-Polymerase vom vektorkodierten T7-Promotor (Ø10)

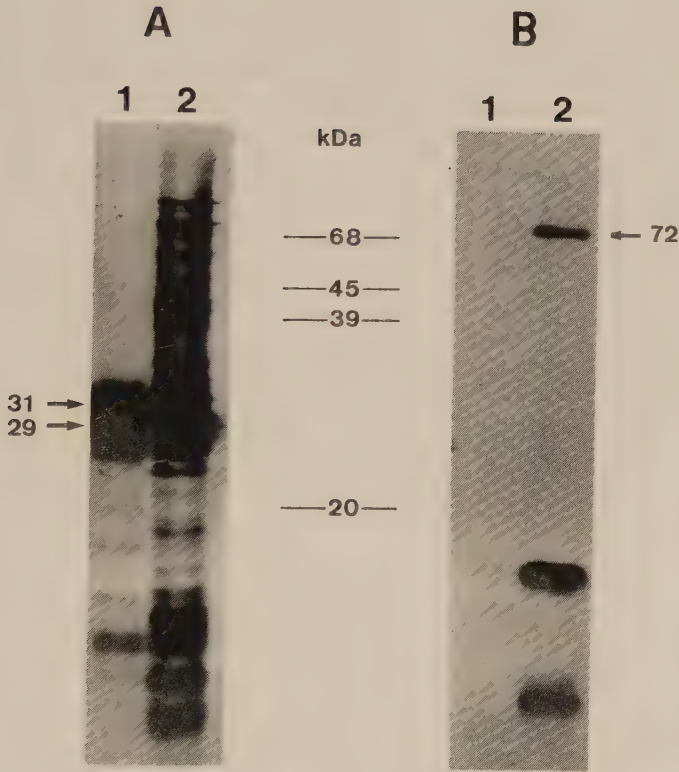


Abbildung 18:

Autoradiogramme ^{35}S -Methionin markierter Extrakte

- A: Spur 1: K38/pGP1-2, pT7-3 (mit Rifampicin-Behandlung)
Spur 2: K38/pGP1-2, pT7-3 (ohne Rifampicin-Behandlung)
- B: Spur 1: K38/pGP1-2, pBN606 (mit Rifampicin-Behandlung)
Spur 2: K38/pGP1-2, pBN605 (mit Rifampicin-Behandlung)

3. Komplementationsanalyse

Wie im letzten Kapitel dargestellt wurde, kodiert das DNA-Insert von Plasmid pBN61 (Abbildung 16) für drei, zumindest partielle Genprodukte. Um die Lage der offenen Leserahmen genauer angeben zu können, wurden zwei Subklone von pBN61 mit der Bezeichnung pBN600 und pBN601 konstruiert und auf ihre Fähigkeit hin überprüft, eine *ntrA*-Mutation (Stamm BN452) zu komplementieren.

Abbildung 19 zeigt die Struktur dieser Derivate im Vergleich zum Ausgangsplasmid pBN61 und das Ergebnis der Komplementationsanalysen. Aus den bereits sequenzierten *ntrA*-Genorten aus *Klebsiella pneumoniae* (126), *Azotobacter vinelandii* (128) und *Rhizobium meliloti* (153) wurde auch die Lage der offenen Leserahmen übernommen.

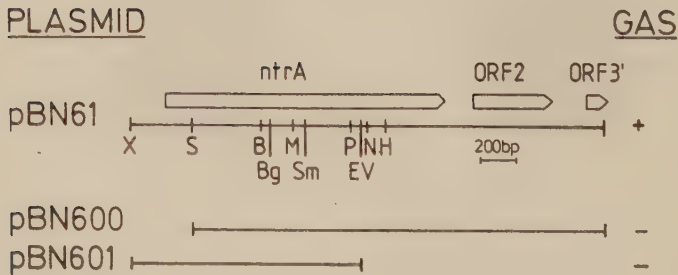


Abbildung 19:

Komplementationsanalyse und wahrscheinliche Lage der offenen Leserahmen in dem klonierten Fragment

Bei dem 20 kDa Protein (siehe Kapitel VII.2.) handelt es sich um ein Protein mit unbekannter Funktion, das auch in den drei oben genannten Organismen unmittelbar 3' zum ntrA-Genort kodiert (ORF2). Wiederum 3' dieses offenen Leserahmens befindet sich wahrscheinlich der Beginn eines weiteren Leserahmens (ORF3'), der für die Synthese eines Rumpfpeptides von 3 bis 5 kDa im T7 Expressionssystem (siehe Kapitel VII.2.) verantwortlich sein dürfte.

4. Einfluß einer erhöhten ntrA-Genkopienzahl auf die Expression von fdhF'-lacZ

Um den Einfluß einer erhöhten ntrA-Genkopienzahl auf die Expression von fdhF'-lacZ zu untersuchen, wurde Plasmid pBN61 mit dem ntrA-Gen aus Escherichia coli in den Stamm BN452/pBN208 (ntrA⁻) transformiert; anschließend wurde die β -Galaktosidase Aktivität nach anaerober Anzucht bestimmt. Tabelle 13 faßt die Ergebnisse dieser Versuche zusammen:

Tabelle 13: Wirkung der erhöhten ntrA-Genkopienzahl auf die Expression von fdhF'-lacZ

Stamm (relevanter Genotyp)	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)		
	Glukose ^a	Glukose	Glukose
	30mM Formiat (anaerob)	10mM Nitrat (anaerob)	
FM420 (pBN208) ntrA ⁺	235	1 309	54
BN452 (pBN208) ntrA ⁻	134	234	63
BN452 (pBN208;pBN61) ntrA ⁻ (ntrA ⁺)	318	1 378	48

a: Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5) mit 0,2 % Glutamin

Folgende Punkte lassen sich daraus ableiten:

- a) Das Plasmid pBN61 (ntrA^+) hebt die Wirkung einer ntrA -Mutation auf die fdhF' - 'lacZ Expression auf.
- b) Die Erhöhung der ntrA -Gendosis bewirkt jedoch keine Steigerung der fdhF' - 'lacZ Expression unter induzierenden Bedingungen. Offenbar stellt das NTRA Protein für die Promotoraktivierung von fdhF keine limitierende Komponente dar.

VIII. Isolierung von Mutanten mit veränderter fdhF'-lacZ Expression

Über chemische Mutagenese der 5' flankierenden Region des fdhF-Gens wurde in diesem Teil der Arbeit versucht, Regulationsmutanten zu erhalten, die durch Sauerstoff und Nitrat nicht mehr reprimiert werden, um auf diese Weise mögliche cis-Strukturelemente im Promotorbereich zu lokalisieren.

1. Plasmidmutagenese

Das Plasmid pBN208, das die gesamte regulatorische Einheit des fdhF-Gens (siehe Abbildungen 6, 7, 9) enthält, wurde in vivo im Stamm E. coli FM909 mit Nitrosoguanidin mutagenisiert. Nach der Mutagenese wurde die Plasmid DNA präpariert und mit EcoRI/BamHI gespalten. Die isolierten 370 bp EcoRI/BamHI Fragmente, die die 5' flankierende Region des fdhF-Gens und den fdhF-Anteil der fdhF'-lacZ Fusion (siehe Abbildung 6) tragen, wurden anschließend in den Vektor pMC1403 (36) kloniert. Nach Transformation des Ligationsansatzes in den Stamm E. coli FM911 wurden die Zellen auf EMB-Agar (siehe "Material und Methoden") mit 50 mM Nitrat ausgespatelt und zwei Tage anaerob bebrütet.

Die 400 erhaltenen Transformanten wiesen auf dem Indikatoragar einen unterschiedlichen Phänotyp auf. Mehr als 95 % aller Kolonien waren schwach Laktose-positiv und zeigten keinen Unterschied im Phänotyp, verglichen mit dem Wildtypstamm FM911/pBN208. Vier Transformanten besaßen einen völlig Laktose-negativen Phänotyp (transparent). Dagegen konnten neun Transformanten nach anaerober Bebrütung auf EMB-Agar mit 50 mM Nitrat Laktose verwerten (Kolonien mit dunklem Zentrum). Diese 13 Klone mit verändertem Phänotyp auf Indikatoragar wurden als mögliche Regulationsmutanten genauer charakterisiert. So wurde die spezifische β -Galaktosidase Aktivität nach Anzucht unter verschiedenen Bedingungen ermittelt. Zehn der getesteten Klone zeigten eine veränderte fdhF'-lacZ Expression, verglichen mit

dem Wildtypstamm FM911/pBN208. Sie wurden nach der maximalen Höhe der β -Galaktosidase Aktivität unter induzierenden Bedingungen und ihrem Phänotyp grob in drei Klassen eingeteilt:

- a) Klasse I: 3 Vertreter (Phänotyp: Laktose +)
- b) Klasse II: 3 Vertreter (Phänotyp: Laktose ++)
- c) Klasse III: 4 Vertreter (Phänotyp: Laktose -)

Tabelle 14 zeigt die β -Galaktosidase Aktivität verschiedener Mutanten aus jeder Klasse im Vergleich mit derjenigen des Wildtypstamms.

Tabelle 14: β -Galaktosidase Aktivität ausgewählter Mutanten

Plasmid ^b	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller-Einheiten)				
	Glukose ^a	Glukose	Glukose	Glukose	Glukose
	30mM Formiat (anaerob)	30mM Formiat (anaerob)	10mM Nitrat (anaerob)	30mM Formiat (aerob)	30mM Formiat (aerob)
pBN208 (Wildtyp)	320	2 770	86	46	52
Klasse I pBN316	500	3 054	175	121	118
Klasse II pBN311	875	10 640	260	159	168
pBN314	1 500	5 000	260	153	141
Klasse III pBN302	25	80	14	< 1	< 1
pBN304	< 1	49	< 1	< 1	< 1

a: Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5)

b: Plasmidrezipient war in allen Fällen E. coli FM911

Folgende Eigenschaften der isolierten Mutanten lassen sich daraus ableiten:

- a) Die "Nitratrepression" ist in keiner Mutante aufgehoben. Die fdhF'-lacZ Expression erreicht nach Anzucht unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat lediglich das Zwei- bis Dreifache des Wildtyps (Ursache für den veränderten Phänotyp der Klassen I und II auf Indikatoragar).
- b) Die Mutanten der Klassen I und II zeigen auch eine leicht erhöhte Expression von fdhF'-lacZ in Anwesenheit von Sauerstoff.
- c) Klasse II Mutanten lassen sich unter anaeroben Bedingungen wesentlich stärker induzieren als der Wildtyp.
- d) Die auf Indikatorplatten phänotypisch Laktose-negativen Mutanten der Klasse III sind Defektmutanten und nehmen eine Sonderstellung ein.

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß mit dem gewählten Mutageneseansatz die gesuchten Regulationsmutanten ohne "Nitratkontrolle" nicht gefunden werden konnten. Ebenso konnten nach einer weiteren Mutagenese unter 5000 Klonen keine fdhF Regulationsmutanten ohne "Sauerstoffkontrolle" identifiziert werden (nicht gezeigt).

2. Lokalisierung der Punktmutationen in einzelnen Mutanten

Die oben beschriebenen Mutanten wiesen zwar dasselbe Regulationsmuster ("Sauerstoff- und Nitratrepression") wie das fdhF Wildtypgen auf, die maximale Höhe der β -Galaktosidase Aktivität unter induzierenden Bedingungen war aber bemerkenswert unterschiedlich (Klassen II und III). Der Ort der Punktmutationen in den einzelnen Mutanten stellte daher eine interessante Frage dar. Durch die angewandte Strategie (Mutagenese und anschließende Subklonierung) war ja gewährleistet, daß die Mutationen nur in dem subklonierten 370 bp EcoRI/BamHI Fragment (siehe VIII.1.) vorkommen konnten. Das entsprechende Fragment aus einzelnen Vertretern wurde deswegen sequenziert.

Abbildung 20 zeigt Ausschnitte aus der Nukleotidsequenz einzelner Mutanten.

Unerwarteterweise hatten die drei Plasmide pBN302, pBN304 und pBN311 (Abbildung 20A) keine Mutationen im fdhF (-12/-24) Promotor oder in dem 40 bp Element der Kontrollregion, das für die Formiatinduktion notwendig ist (siehe Kapitel III), sondern Basenaustausche direkt in oder in der Umgebung der Shine-Dalgarno Sequenz (176). Die Bedeutung dieser Sequenzen für die posttranskriptionelle Steuerung der Genexpression wurde auch schon in anderen Systemen nachgewiesen:

- Eine starke Reduzierung der Genexpression durch Austausch des GG-Paares in der Shine-Dalgarno Sequenz gegen GA (analog pBN302) wurde auch für lamB-Expressionsmutanten von E. coli beschrieben (171).
- Das Einführen von AT-Paaren 3' zur Shine-Dalgarno Sequenz führt nach Hui et al. (84) zu einer Steigerung der Genexpression. Das könnte auch im Fall der Mutante pBN311 die Ursache für die hohe β -Galaktosidase Aktivität von FM911/pBN311 (siehe Tabelle 14) sein.
- Basenaustausche im sogenannten -1 Kodon, wie in pBN304, können die Effizienz der Translationsinitiation ebenfalls stark beeinflussen und zu einer Verminderung der Genexpression führen (84).

Im Plasmid pBN314 wurden im Gegensatz zu den bisher charakterisierten Plasmiden zwei Punktmutationen lokalisiert (Abbildung 20B). Durch die beiden Basenaustausche $C_{107} \rightarrow T_{107}$ und $C_{198} \rightarrow T_{198}$ entstehen jeweils Motive mit Sequenzhomologie zu dem -35 Strukturelement von E. coli -10/-35 Promotoren: TTGACA (154). Im Abstand von 15 beziehungsweise 18 Basenpaaren befinden sich in der Sequenz Primärstrukturelemente mit hoher Homologie zum -10 Motiv (154).

siehe folgend Abbildung 20

A

	<u>Sequenzausschnitte</u>	<u>Wirkung der Punktmutationen</u>
16SrRNA (3' Ende)	3'-AUUCCUCCACU-5'	
fdhF (Wildtyp)	5'- <u>ACTGGAGCGAGACCGATG</u> -3'	
pBN302	5'-ACTGAAGCGAGACCGATG-3'	↓
pBN311	5'-ACTGGAGTGAGACCGATG-3'	↑
pBN304	5'-ACTGGAGCGAGATCGATG-3'	↓

B

GGCGGGGGGTATCAGGCAGGTCCCGTCGTCGAGAAAAAATAAAATGTCTGCCGCGTGATG 60
 GCTGTCACGCGGTATTTTCGTTTCGTCACGTCAAACTGACGACAGCTTGTTTTCGTCAG 107 120
 * -35
 AGTTTTGAATAAATAGTGCCCGTAATATCAGGGAATGACCCACATAAAATGTGGCAATA 180
 -10 -24
 AAGATGCATACTGTAGTTGAGAGGCGCGTATGCGTGATTGATTAACTGGAGCGAGACCG 198
 -12 * -35 -10
ATG AAA AAA GTC GTC ACG GTT TGC CCC TAT TGC GCA TCA GGT TGC

Abbildung 20:

Nukleotidsequenz der charakterisierten Mutanten
aus Klassen II und III

A: Punktmutationen in der Shine-Dalgarno Sequenz und benachbarten Nukleotiden und deren Einfluß auf die Expression.

B: 5' flankierende Region der fdhF'-lacZ Fusion im Plasmid pBN314. * Punktmutationen ($C_{107} \rightarrow T_{107}$, $C_{198} \rightarrow T_{198}$); unterstrichene Nukleotide: Shine-Dalgarno Sequenz und Translationsinitiationskodon

3. Analyse der Mutante pBN314

Wie im letzten Abschnitt erläutert wurde, läßt das Ergebnis der Sequenzanalyse der fdhF'-lacZ 5' flankierenden Region von Plasmid pBN314 vermuten, daß durch die Mutagenese zusätzliche Promotoren vom -10/-35 Typ im fdhF-Promotorbereich entstanden sein könnten, die für die erhöhte β -Galaktosidase Aktivität unter induzierenden wie unter reprimierenden Bedingungen verantwortlich sind (siehe Tabelle 14). Ein wichtiger Hinweis für die Aktivität von solchen zusätzlichen Promotoren wurde durch die Untersuchung der β -Galaktosidase Expression in einem ntrA⁻ Stamm (BN452) erhalten. Wie in den Kapiteln VI. und VII. nachgewiesen werden konnte, ist die Erkennung des fdhF Promotors durch die RNA Polymerase abhängig von einem funktionellen NTRA Protein (σ^{54}). In einem ntrA⁻ Stamm sollte daher die Wirkung von zusätzlichen (NTRA-unabhängigen) Promotoren auf dem Plasmid pBN314 besonders deutlich zu sehen sein. Tabelle 15 faßt die Ergebnisse der Enzymtests zusammen:

Tabelle 15: Einfluß einer ntrA-Mutation auf die β -Galaktosidase Expression der fdhF'-lacZ Fusion von Plasmid pBN314

Plasmid ^b	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)				
	Glukose ^a	Glukose	Glukose	Glukose	Glukose
	(anaerob)	30mM Formiat (anaerob)	10mM Nitrat (anaerob)	30mM Formiat (aerob)	30mM Formiat (aerob)
pBN208 (Wildtyp)	235	380	130	52	60
pBN314 (C ₁₀₇ → T ₁₀₇ ; C ₁₉₈ → T ₁₉₈)	917	1 536	394	106	96

a: Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5) mit 0,2 % Glutamin

b: Rezipient der Plasmide war E. coli BN452 (ntrA⁻)

Aus diesen Daten ergeben sich einige interessante Gesichtspunkte:

- a) Die *fdhF'*-*'lacZ* Fusion in Stamm BN452/pBN314 (*ntrA*⁻) wird nicht konstitutiv exprimiert. Die β -Galaktosidase Aktivität ist aber unter allen Bedingungen (2- bis 4-fach) im Vergleich zum Wildtyp erhöht.
- b) Unter anaeroben Bedingungen wird die *fdhF'*-*'lacZ* Expression im Stamm BN452/pBN314 wesentlich stärker induziert als in BN452/pBN208. Dieses Ergebnis kann nur über die Aktivität von zusätzlichen NTRA-unabhängigen Promotoren erklärt werden. Daraus ließe sich aber auch folgern, daß die anaerobe Induktion des *fdhF*-Gens in Gegenwart von Formiat möglicherweise nicht absolut zwingend einen NTRA-abhängigen Promotor benötigt (siehe auch "Diskussion").

IX. Einfluß von Metallionen auf die Aktivierung von fdhF'-lacZ

Nach den bisher bekannten Daten ist die Formiatdehydrogenase (H) ein Molybdo-Seleno-Protein (146, 210). Die Aktivität des FHL-Komplexes ist außerdem Nickel-abhängig, wie durch Mutantenstudien in verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte (196, 203).

Aus dieser Tatsache ergibt sich die wichtige Frage, ob Metallionen in der Regulation der beteiligten Gene eine Rolle spielen. In Kapitel II dieser Arbeit wurde bereits nachgewiesen, daß Selen für den Start der Transkription im fdhF Promotorbereich unbedeutend ist. Im folgenden sollen nun Versuche beschrieben werden, die einen ersten Hinweis auf die Beteiligung von anderen Metallionen als Selen an der Regulation liefern.

1. Effekt von Dipyridyl auf die Expression von fdhF'-lacZ

Dipyridyl (2,2'-Bipyridin) ist ein bekannter Chelatkomplexbildner zweiwertiger Kationen, der bevorzugt Eisen(II)-Ionen, aber unter anderem auch Kupfer(II)-, Nickel(II)- und Zink-Ionen komplexieren kann (132). Die Substanz wird in der biologischen Forschung in erster Linie zur Erzeugung von Eisenmangel in Kulturmedien eingesetzt (76).

Der Effekt von steigenden Konzentrationen an Dipyridyl auf die Expression von fdhF wurde mit dem Stamm FM911/pBN208 untersucht. Die Zellen wurden zuerst durch Kultivierung auf TGYEP-Platten mit 200 µM Dipyridyl an Eisenmangelbedingungen adaptiert und anschließend in Flüssigkulturen mit steigenden Mengen an Dipyridyl anaerob angezogen. Abbildung 21 zeigt die spezifische β -Galaktosidase Aktivität in den Zellen als Funktion der Dipyridylkonzentration im Anzuchtmedium.

Die Experimente belegen klar, daß Dipyridyl in einer Konzentration über 50 µM einen hemmenden Einfluß auf die fdhF'-lacZ Expression ausübt. In Anwesenheit von 150 µM und 200 µM

Dipyridyl sind noch ungefähr 7 % der maximal erreichbaren β -Galaktosidase Aktivität meßbar.

Im Anschluß daran konnte von B. Suppmann auch ein ähnlicher Einfluß von EDTA und o-Phenanthrolin auf die fdhF'-lacZ Expression nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung).

Der hemmende Effekt von Dipyridyl auf die fdhF'-lacZ Expression ließ sich durch die Zugabe von Fe(II)SO_4 , nicht aber durch den Zusatz von Na_2MoO_4 , wieder aufheben (Ergebnisse nicht gezeigt).

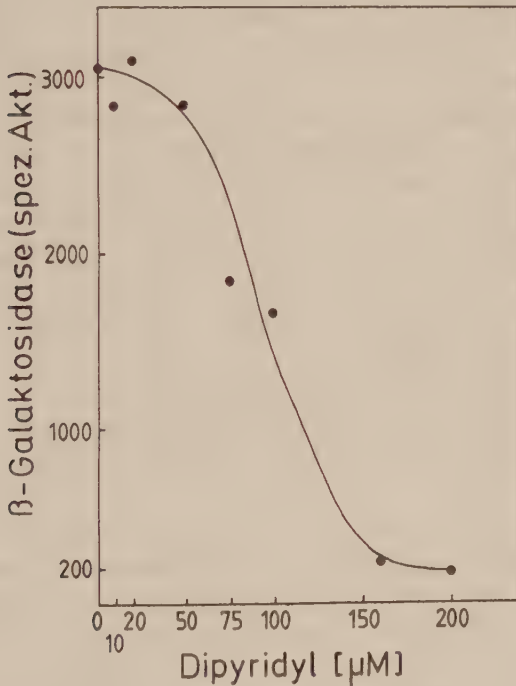


Abbildung 21:

Einfluß von Dipyridyl auf die Expression von fdhF'-lacZ

Anaerobe Anzucht von FM911/pBN208 in TGYEP-Medium (pH 6,5) mit 30 mM Formiat und steigenden Konzentrationen an Dipyridyl

2. Expression von fdhF'-lacZ in einer fur Mutante

Der Effekt von Dipyridyl läßt auf einen möglichen Einfluß von Fe(II)-Ionen auf die Regulation des fdhF-Gens schließen. Eine Beteiligung von Eisenionen an der Regulation der Genexpression wurde bereits für die verschiedenen Fe(II) und Fe(III) Transportsysteme in *Escherichia coli* beschrieben. Eisenregulation wird bei diesen Genen durch das Regulatorprotein FUR vermittelt (76, 77, 79). Auch fur⁻ Mutanten weisen einen pleiotropen Phänotyp auf und können beispielsweise auf Succinat, Fumarat oder Acetat nicht mehr wachsen (10, 78). Um eine mögliche Beteiligung des FUR Proteins an der fdhF Regulation zu untersuchen, wurde die Expression von fdhF'-lacZ in einer fur⁻ Mutante untersucht.

Zuerst wurde das fur-31 Allel aus dem Stamm H1673 mit dem Phagen P₁ in den Stamm MC4100 transduziert, da alle Regulationsstudien in diesem genetischen Hintergrund durchgeführt worden waren. Der FUR⁻ Phänotyp der Transduktanten wurde durch Anzucht auf Minimalagar mit Succinat als Kohlenstoffquelle überprüft (kein Wachstum). Eine der erhaltenen Transduktanten (BN460) wurde mit dem Plasmid pBN208, das die fdhF'-lacZ Fusion enthielt, transformiert.

Tabelle 16 zeigt die β -Galaktosidase Aktivität in Stamm BN460/pBN208 nach Anzucht unter verschiedenen Bedingungen.

Nach diesen Ergebnissen kann eine Beteiligung des FUR Proteins an der fdhF Regulation ziemlich sicher ausgeschlossen werden. Die Reduzierung der fdhF'-lacZ Expression im fur⁻ Stamm unter induzierenden Bedingungen um ungefähr ein Drittel, ist wahrscheinlich auf einen indirekten Effekt zurückzuführen. Die "Nitrat"- und die "Sauerstoffrepression" (Ergebnis nicht gezeigt) sind auch in der fur⁻ Mutante unverändert zu beobachten.

siehe folgend Tabelle 16

Tabelle 16: Expression von $fdhF'$ - $'lacZ$ (pBN208) in einer fur^- Mutante

Stamm	relevanter Genotyp	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)		
		Glukose ^a	Glukose 30mM Formiat	Glukose 10mM Nitrat
MC4100/pBN208	fur^+	412	2 190	73
BN460/pBN208	fur^-	314	1 470	43

a: Anzuchten anaerob in TGYEP-Medium (pH 6,5)

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß zweiwertige Kationen, möglicherweise Fe(II), eine Funktion bei der anaeroben Induktion des $fdhF$ -Gens ausüben und daß diese Regulation jedoch nicht durch das "Eisenregulatorprotein" FUR gesteuert wird.

X. Analyse des cis-regulatorischen DNA-Elements

in der fdhF Kontrollregion

Nuklease Bal31 Verkürzung des 5' flankierenden Bereichs des fdhF-Gens hat gezeigt, daß ein 40 bp langes DNA-Element, das ungefähr 100 Basenpaare 5' zum Transkriptionsstart lokalisiert ist, notwendig für die Formiatinduktion des fdhF Promotors ist (siehe Kapitel III). In den letzten Jahren wurden für eine Reihe von prokaryontischen Systemen ähnliche Regulatorelemente beschrieben, die in beträchtlichem Abstand zum eigentlichen Promotorbereich die Transkription der entsprechenden Gene aktivieren (32, 136, 151, 193). In Anlehnung an diese publizierten Beispiele wird das regulatorische DNA-Element von fdhF im folgenden als "upstream regulatory sequence" (URS) bezeichnet.

1. Nuklease Bal31 Verkürzung des URS-Elements

Wie in Kapitel III bereits dargelegt, befindet sich das entscheidende DNA-Element zwischen den Positionen -142 und -101 relativ zum Transkriptionsstart des fdhF-Gens. Um die regulatorischen Sequenzen genauer angeben zu können, wurde dieser Bereich durch Behandlung mit "Slow-Bal31 Nuklease" schrittweise verkürzt. Das Plasmid pBN210 wurde dazu mit EcoRI linearisiert und anschließend mit Exonuklease behandelt (Abbildung 22). Vorhandene 5' überhängende DNA-Enden wurden dann mit DNA Polymerase I (Klenow Fragment) aufgefüllt. Nach der Ligation von 10mer EcoRI Linkern wurde die DNA mit EcoRI/NsiI gespalten und in einem 2%igen präparativen Agarosegel aufgetrennt. Die 100 bis 140 bp langen EcoRI/NsiI Fragmente wurden isoliert und in die EcoRI-, NsiI-Spaltstellen des Plasmids pBN205 (Kapitel III) kloniert. Nach Transformation in den Stamm E. coli DH1 wurde aus 48 der erhaltenen Transformanten die Plasmid DNA isoliert. Nach Spaltung mit EcoRI und NsiI wurden die Fragmente an der EcoRI-Stelle mit α -³²P-dATP 3' markiert. Die Fragmente konnten jetzt für eine Größenselektion in einem 8 % Sequenzgel aufgetrennt werden. Unter den 48 Plasmiden konnten

auf diese Weise neun, mit geeignet verkürztem URS-Element, identifiziert werden, die im Anschluß daran genauer analysiert wurden. Der exakte Endpunkt der 5' Deletionen wurde durch DNA Sequenzierung ermittelt (Abbildung 22). Die Plasmide erhielten die Bezeichnungen: pBN2101 (-139); pBN2102 (-132); pBN2103 (-131); pBN2104 und pBN2105 (-129); pBN2106 (-127); pBN2107 (-121); pBN2108 (-116); pBN2109 (-108).

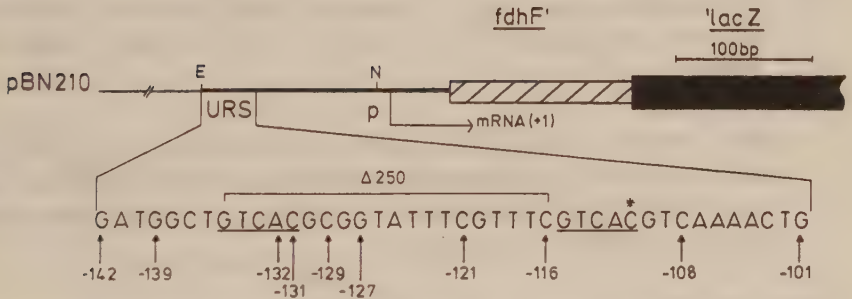


Abbildung 22:

Strategie der "Slow-Bal31 Nuklease" Verkürzung von pBN210

p: fdhF-Promotor

Unterstrichene Nukleotide: MaeIII-Spaltstellen

Δ 250: interne Deletion im Plasmid pBN250 (siehe auch Tab. 18)

↑ Endpunkte der 5' Deletionen in verschiedenen Mutanten (Position der EcoRI-Stelle) und Abstand zum Transkriptionsstartpunkt (+1)

* Bezugspunkt im URS-Element für alle Abstandsberechnungen zwischen URS-Element und dem Transkriptionsstart

2. β -Galaktosidase Aktivität der 5' Deletionsmutanten

Die Plasmide pBN2101 bis pBN2109 wurden in E.coli FM911 transformiert. Nach Anzucht unter verschiedenen Bedingungen wurde die β -Galaktosidase Aktivität der Transformanten bestimmt. Abbildung 23 zeigt die Höhe der fdhF'-lacZ Expression in den einzelnen Transformanten. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

- a) Die Verkürzung des regulatorischen DNA-Elements um 20 bp (bis Position -121) hat eine Reduzierung der fdhF'-lacZ Expression auf ungefähr 60 % des Werts des Ausgangsplasmids pBN210 (Position -142) zur Folge.
- b) Werden noch weitere 13 Basenpaare (bis Position -108) des URS-Elements deletiert, kann der fdhF Promotor unter anaeroben Bedingungen nicht mehr durch Formiat aktiviert werden.
- c) Bei Anzucht unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat und unter aeroben Bedingungen (Ergebnisse nicht gezeigt) ist die fdhF'-lacZ Expression in allen 5' Deletionsmutanten (wie im Wildtyp) reprimiert.

Das URS-Element des fdhF Gens läßt sich demnach folgendermaßen beschreiben: Zwischen den Positionen -108 und -121 befindet sich ein essentielles regulatorisches Element für die Formiatinduktion. Auch die an der 5' Seite anschließenden 20 Basenpaare (-142 bis -121) sind jedoch für die volle Aktivierbarkeit des fdhF Promotors wesentlich. Interessanterweise zeigen Deletionsmutanten, die bis in diesen Bereich verkürzt worden waren (pBN2101 bis pBN2106), eine charakteristische und reproduzierbare Schwankung in der fdhF'-lacZ Expression (siehe Abbildung 23). Da alle Deletionsmutanten durch die gewählte Klonierungsstrategie (siehe X.1.) 5' der klonierten DNA Fragmente identische Vektoranteile enthalten, ist dieses Phänomen möglicherweise auf die unterschiedliche Position des AT-reichen EcoRI Linkers zum Regulatorelement zurückzuführen.

Eine ähnliche Beobachtung wurde von Lamond und Travers (107) auch für die *tyrT*-Promotorregion von *E. coli* beschrieben.

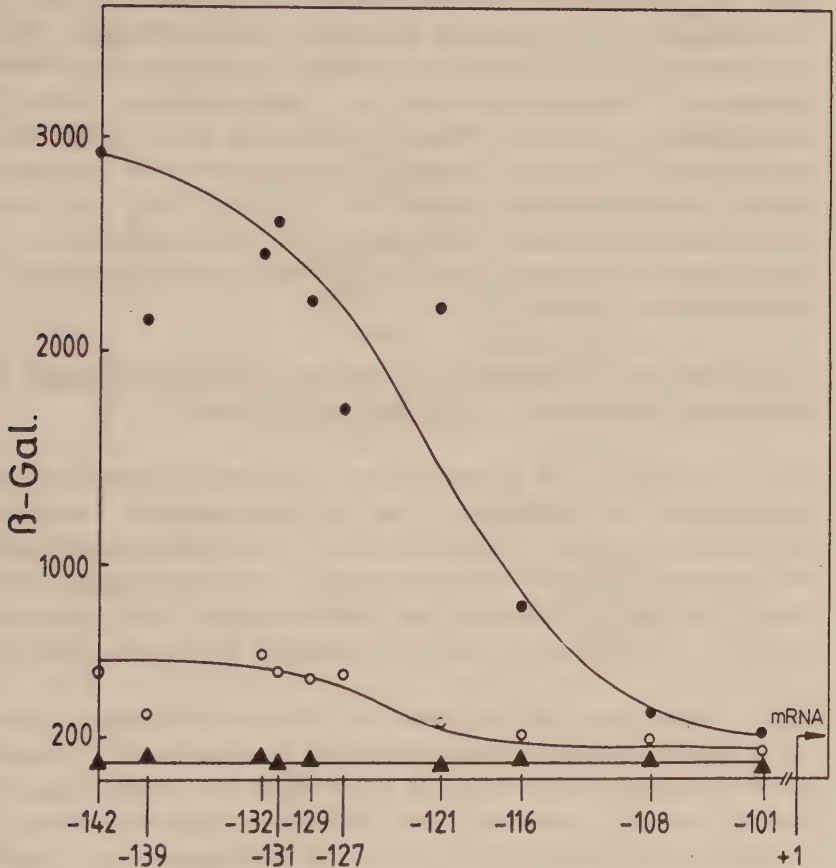


Abbildung 23:
Expression der β -Galaktosidase Aktivität in
5' Deletionsmutanten von pBN210

Plasmidrezipient: FM911
Anaerobe Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5)

● TGYEP + 30 mM Formiat

○ TGYEP

▲ TGYEP + 10 mM Nitrat

Die Endpunkte der 5' Deletionen in Bezug auf den
Transkriptionsstart sind auf der Abszisse angegeben.

3. Einfluß von Abstand und Orientierung des URS-Elements auf die Aktivierung des fdhF-Promotors

Ein Teil der bisher charakterisierten URS-Elemente oder auch UAS-Elemente (für "upstream activator sequence") weist Eigenschaften auf, die mit eukaryontischen, sogenannten "enhancer" Elementen, vergleichbar sind (12). Das bedeutet, daß solche DNA-Elemente in beiden Orientierungen und auch in großem Abstand (über 1 kb) zum Promotor die Transkription der betreffenden Gene stimulieren können (32, 48, 71, 151). Mit den im folgenden beschriebenen Experimenten wurde untersucht, ob das URS-Element des fdhF-Promotors solche "enhancer"-ähnlichen Eigenschaften besitzt.

Klonierung des URS-Elements in beiden Orientierungen und verschiedenen Abständen relativ zum fdhF-Promotor

Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, hat das cis-regulatorische DNA-Element des fdhF-Gens, das für die maximale Aktivierung des fdhF Promotors erforderlich ist, eine Länge von ungefähr 40 Basenpaaren. Um dieses DNA-Element in beiden Orientierungen und in beliebiger Distanz zum fdhF-Promotor positionieren zu können, wurde folgendermaßen vorgegangen (siehe Abbildung 24):

Die in Abbildung 22 gezeigten 40 Nukleotide wurden chemisch (als doppelsträngiges Oligonukleotid) synthetisiert, wobei am 5' Ende ein AatII Linker und am 3' Ende ein EcoRI Linker angefügt wurde. Parallel dazu wurde in gleicher Weise ein synthetisches DNA-Fragment mit dem URS-Element in inverser Orientierung im Vergleich zum Wildtypgen hergestellt (siehe auch "Material und Methoden" und folgende Abbildung 27).

Diese synthetischen AatII/EcoRI Fragmente wurden in den Vektor pBR322 (28) kloniert. Nach Transformation der Ligationsansätze in E. coli DH1 wurde für jeden der beiden Parallelansätze aus 50 der erhaltenen Transformanten die Plasmid DNA isoliert und in einer DNA Dot Blot Hybridisierung analysiert. Als DNA Sonde wurde jeweils eines der am 5' Ende markierten Oligonukleotide eingesetzt.

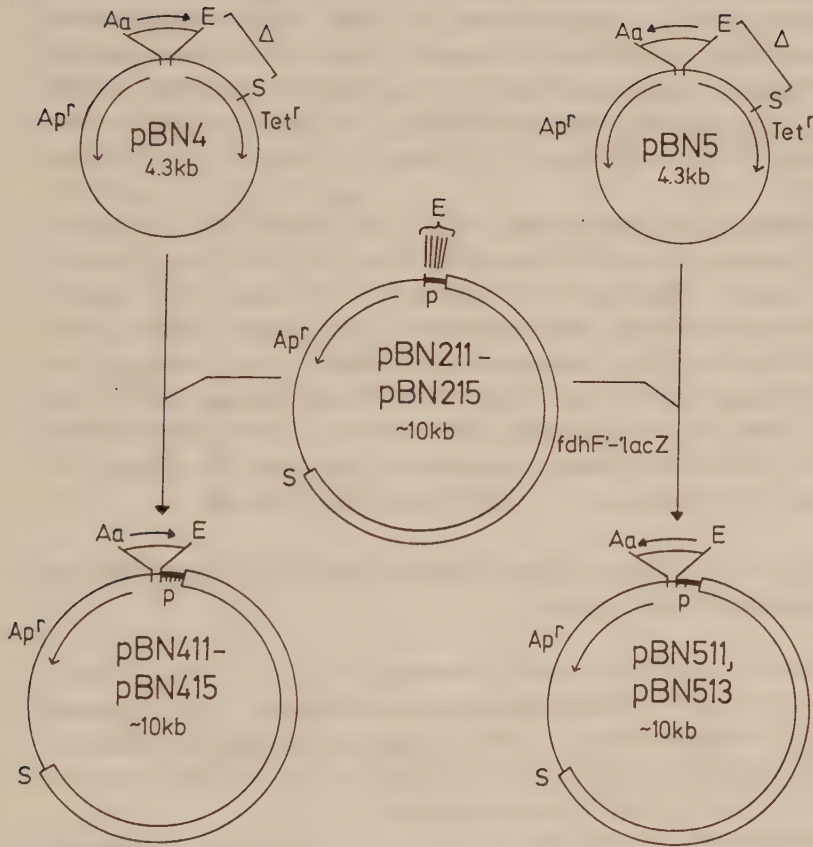


Abbildung 24:

Strategie zur Klonierung des URS-Elements in beiden Orientierungen und verschiedenen Abständen 5' zum *fdhF* Promotor

Δ : EcoRI/SalI Fragment aus pBR322, das in allen Derivaten von pBN4 und pBN5 deletiert wurde.

|||: Position der EcoRI-Stelle in den verschiedenen Deletionsklonen pBN211 - pBN215 (siehe auch Abb. 6)

p: *fdhF* Promotor, $\longrightarrow$ Orientierung des URS - Elements wie im Wildtypgen, $\longleftarrow$ inverse Orientierung des URS-Elements

Das Ergebnis der Hybridisierungen war wie folgt: In einem Fall enthielten 30 %, im anderen Fall 50 % der isolierten Plasmide das gewünschte AatII/EcoRI Fragment. Aus jedem Ansatz wurden zwei Plasmide ausgewählt und die klonierten Fragmente wurden mittels DNA Sequenzierung überprüft. Die zwei Plasmide pBN4 und pBN5 (siehe Abbildung 24) wurden für weitere Klonierungen verwendet.

Die EcoRI/SalI Fragmente aus pBN211 bis pBN215 mit der fdhF'-'lacZ Fusion und verschiedenen Anteilen der fdhF 5' flankierenden Region (Kapitel III) wurden in die EcoRI/SalI Spaltstellen des Plasmids pBN4 inseriert. Die rekombinanten Plasmide erhielten die Bezeichnungen pBN411 bis pBN415. In gleicher Weise wurden die EcoRI/SalI Fragmente aus pBN211 und pBN213 auch in das Plasmid pBN5 kloniert. Die entstandenen Plasmide pBN511 und pBN513 enthielten also das URS-Element in inverser Orientierung 5', relativ zum fdhF Promotor.

Einfluß des Abstands zwischen Promotor und URS-Element auf die Expression von fdhF'-'lacZ

Die Plasmide pBN411 bis pBN415 wurden in E. coli FM911 transformiert und die β -Galaktosidase Aktivität der Transformanten wurde nach Anzucht unter verschiedenen Bedingungen bestimmt. Das Histogramm in Abbildung 25 zeigt die fdhF'-'lacZ Expression in den einzelnen Transformanten.

Als Bezugspunkt im URS-Element für die (und alle folgenden) Abstandsberechnungen wurde der in Abbildung 22 mit * gekennzeichnete Cytosinrest gewählt.

Nach diesen Ergebnissen hat eine Vergrößerung des Abstands zwischen Transkriptionsstartpunkt und URS-Element um exakt zehn Basenpaare keinen Einfluß auf die fdhF'-'lacZ Expression (pBN411). Dagegen bewirkt die Verkürzung des Abstandes um 13 beziehungsweise 23 Basenpaare (pBN412, pBN413) eine drastische Verringerung der Genexpression. Wird das URS-Element näher als 87 bp an den Transkriptionsstart herangerückt (pBN414, pBN415), kann es offenbar keine Funktion in der Promotoraktivierung mehr ausüben (Vergleich mit pBN211, ohne URS-Element).

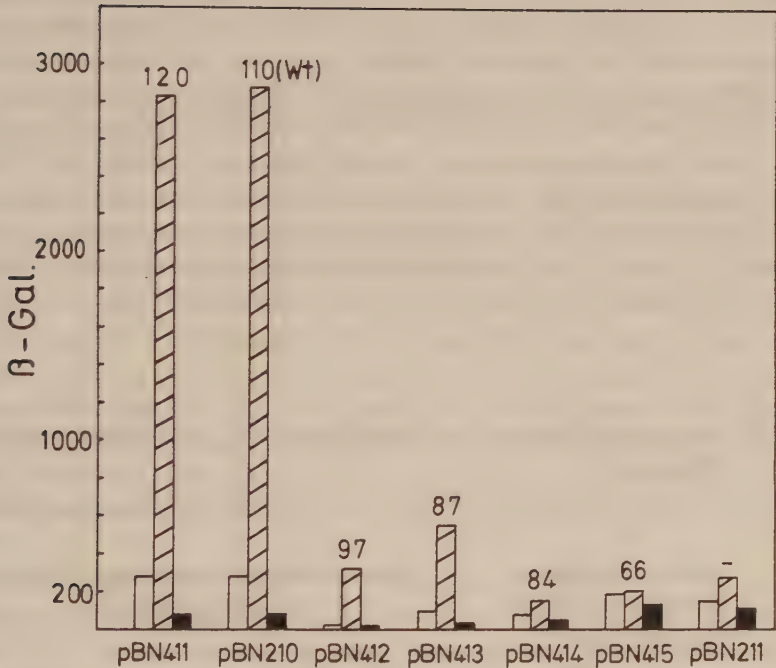


Abbildung 25:

Einfluß des Abstands zwischen Transkriptionsstart und URS-Element auf die Expression von *fdhF'*-*'lacZ*

Plasmidrezipient: FM911

Anzuchten anaerob in TGYEP-Medium (pH 6,5);

leere Balken: TGYEP, schraffierte Balken: TGYEP + 30 mM Formiat, schwarze Balken: TGYEP + 10 mM Nitrat

Die Zahlen über den Balken geben den Abstand zwischen Transkriptionsstart und URS-Element in den einzelnen Plasmiden an

Die Abstandsveränderungen zwischen Promotor und URS-Element haben dabei keinen Einfluß auf die beobachtete "Nitrat"- und "Sauerstoffrepression" (nicht gezeigt) des fdhF-Promotors. Durch die Insertion des 2 kb großen Ω -Elements (147) in die singuläre EcoRI-Stelle des Plasmids pBN411 (Abbildung 24) wurde der Abstand zwischen URS-Element und Transkriptionsstartpunkt um 2 kb gespreizt (pBN411 Ω). Um nachzuweisen, daß alle Transkripte, die innerhalb des Ω -Fragments beginnen, an den flankierenden Transkriptionsterminatoren terminiert werden, wurde zur Kontrolle das Plasmid pBN211 Ω konstruiert. Es enthält das Ω -Element, inseriert in die singuläre EcoRI-Stelle des Plasmids pBN211 5' zur Promotorregion des fdhF Gens. Tabelle 17 zeigt die β -Galaktosidase Aktivität in dem Stamm FM911 nach Transformation mit den beschriebenen Plasmiden.

Tabelle 17: Aktivierende Funktion des URS-Elements in 2 kb Abstand zum fdhF-Promotor

Plasmid ^b	Abstand zwischen Transkriptionsstart und URS-Element	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)		
		Glukose ^a	Glukose	Glukose
		(anaerob)	30mM Formiat (anaerob)	10mM Nitrat (anaerob)
pBN210	110 bp (Wildtyp)	280	2 877	86
pBN411	120 bp	319	2 839	84
pBN411 Ω	120 bp + 2 kb	183	539	81
pBN211 Ω	- ^c	172	277	68
pBN211	- ^c	141	272	111

a: Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5); b: Plasmidrezipient war in allen Fällen E. coli FM911; c: Plasmid ohne URS-Element

Die Ergebnisse mit FM911/pBN411 Ω belegen klar, daß das URS-Element des fdhF-Gens auch noch in mehr als 2 kb Distanz zum fdhF-Promotor die Transkription stimulieren kann. Die fdhF'-lacZ Expression erreicht zwar nur noch ungefähr 20 % des Wildtyp-Wertes; sie liegt aber auf alle Fälle deutlich über dem Kontrollwert des Plasmids pBN211 (ohne URS-Element).

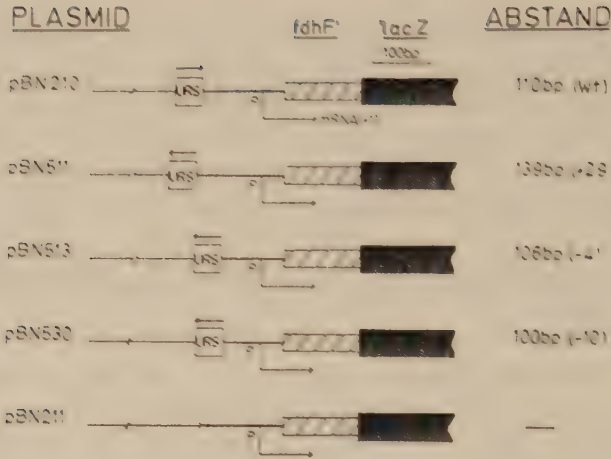
Einfluß der Orientierung des URS-Elements auf die Expression von fdhF'-lacZ

Die Frage nach der Funktionsfähigkeit des URS-Elements in inverser Orientierung zum fdhF-Promotor konnte mit Hilfe der Plasmide pBN511 und pBN513 (siehe Abbildung 24) beantwortet werden. Zusätzlich wurde noch aus pBN513 das Derivat pBN530 konstruiert: Das Plasmid pBN513 (Abbildung 24) wurde dazu mit EcoRI linearisiert, anschließend mit DNA Polymerase I (Klenow Fragment) behandelt und religiert. Wie die Sequenzierung eines der erhaltenen Plasmide ergab, fand aber entgegen der erwarteten "Auffüllreaktion" an der EcoRI-Stelle eine Deletion von vier Basenpaaren statt.

Abbildung 26A zeigt eine schematische Darstellung der einzelnen Plasmidkonstrukte, und das Histogramm in Abbildung 26B gibt die Expression von fdhF'-lacZ in Stamm FM911 nach Transformation mit den verschiedenen Plasmiden wieder. Nach diesen Experimenten kann das URS-Element auch in inverser Orientierung die Transkription des fdhF-Promotors stimulieren. Eine entscheidene Bedeutung für die Stärke der fdhF'-lacZ Aktivierung hat aber auch in diesem Fall der Abstand zwischen URS-Element und Promotor. In den hier getesteten Varianten erlaubt das Plasmid mit 100 bp Abstand (pBN530) eindeutig die höchste Expression von fdhF'-lacZ (34 % des Wildtypgens), dagegen ist das URS-Element in einem Abstand von 106 bp zum Promotor (pBN513) bedeutungslos für die Formiatinduktion (vergleiche pBN211).

siehe folgend Abbildung 26

A



B

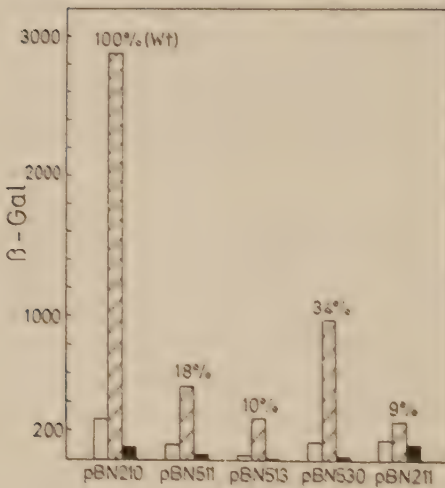


Abbildung 26:

Funktion des URS-Elements in inverser Orientierung

A: Schematische Darstellung der einzelnen Plasmide (Abstand zwischen Transkriptionsstart und URS-Element).

p: fdhF-Promotor, → Orientierung des URS-Elements wie im Wildtypgen, ← inverse Orientierung des URS-Elements.

B: β -Galaktosidase Aktivität der fdhF'-lacZ Fusionen. Plasmidrezipient: FM911; anaerobe Anzuchten in TGYE-Medium (pH 6.5); leere Balken: TGYE, schraffierte Balken: TGYE+30 mM Formiat, schwarze Balken: TGYE+10 mM Nitrat.

4. Konstruktion und Analyse von Mutanten mit Veränderungen im URS Element

Die Charakterisierung der 5' Deletionsmutanten (siehe X.2.) ergab, daß die für die Funktion des URS-Elements entscheidenden Sequenzen zwischen den Positionen -142 und -108 lokalisiert sind. Die Bedeutung dieser DNA-Region sollte nun im weiteren mit Hilfe von Mutanten bestätigt werden.

Die Punktmutante pBN4111 mit einer G → A Transition an Position -110 (siehe Tabelle 18) wurde in analoger Weise wie das Plasmid pBN411 (Abbildung 24) konstruiert.

Die Deletionsmutante pBN250 mit einer internen Deletion im URS-Element wurde aus dem Plasmid pBN205 (Kapitel III) hergestellt. Dabei wurde das angegebene 20 bp MaeIII Fragment (siehe Tabelle 18 und Abbildung 22) aus pBN205 deletiert.

Die Plasmide pBN4111 und pBN250 wurden in den Stamm FM911 transformiert und nach Anzucht unter verschiedenen Bedingungen wurde die β-Galaktosidase Aktivität ermittelt (Tabelle 19). Die Punktmutation und die 20 bp Deletion bewirken eine 50%ige Reduzierung der fdhF'-lacZ Expression unter anaeroben Bedingungen mit Formiat. Die im Wildtyp beobachtete "Repression" durch Sauerstoff (Ergebnisse nicht gezeigt) und anaerob durch Nitrat, ist auch in den beiden getesteten Mutanten unverändert zu sehen.

Diese Mutantenstudien bestätigen also die mit den 5' Deletionsmutanten erhaltenen Daten und unterstreichen die Bedeutung dieses cis-regulatorischen DNA-Elements für die Formiat-induktion des fdhF-Promotors.

Interessanterweise ist die Deletionsmutante pBN250 aber immer noch zu 50 % aktivierbar, was nur so gedeutet werden kann, daß wichtige Teile des URS-Elements durch die Deletion nicht erfaßt werden. Diese Aussage korreliert sehr gut mit den Ergebnissen aus der Analyse der 5' Deletionsmutanten, da mit Hilfe dieser Mutanten ein wichtiges Sequenzmotiv zwischen den Positionen -121 und -108 lokalisiert werden konnte (vergleiche Abbildung 23 und Tabelle 18).

Tabelle 18: Ausschnitte aus der Nukleotidsequenz von Mutanten mit Veränderungen im URS-Element

Plasmid	Sequenz im URS-Element		
	-142	-121	-108
pBN411 (Wildtyp)	5'-GATGGCTGTCACGCGGTATTTGTTTCGTCACGTCAAAACTG-3'		
pBN4111 (*G → A Transition)	5'-GATGGCTGTCACGCGGTATTTGTTTCGTCACATCAAAACTG-3'		
pBN250 (20 bp Deletion)	5'-GATGGCT Δ GTCACGTCAAAACTG-3'		

Unterstrichene Sequenz: MaeIII Stelle

Tabelle 19: Einfluß von Mutationen im URS-Element auf die Expression von fdhF'
- 'lacZ

Plasmid ^b	Spezifische β-Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)		
	Glukose ^a (anaerob)	Glukose 30 mM Formiat (anaerob)	Glukose 10 mM Nitrat (anaerob)
pBN411	319	2 839	84
pBN4111	225	1 431	92
pBN250	250	1 694	111

a: Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5)

b: Plasmidrezipient war in allen Fällen E. coli FM911

5. Aktivierung der fdhF'-lacZ Expression mit verkürzten URS-Elementen

Die anhand des Deletionsplasmids pBN250 erhaltenen Ergebnisse deuteten darauf hin, daß zumindest für eine partielle Aktivierung des fdhF-Promotors auch bestimmte Teile des URS-Elements ausreichen könnten, wobei die "Nitrat"- und "Sauerstoffkontrolle" durch die Verkürzung des regulatorischen DNA-Elements aber unbeeinflusst bleiben. Diese Annahme wurde durch die Klonierung von verkürzten Segmenten des 40 bp URS-Elements geprüft (Abbildung 22).

Klonierungsstrategie:

Im wesentlichen wurde genauso wie bei der Konstruktion des Plasmides pBN411 vorgegangen (siehe Abbildung 24). Wiederum wurden chemisch synthetisierte, kurze DNA-Fragmente mit Anteilen des URS-Elements in den Vektor pBR322 kloniert. Um die Selektion der gewünschten rekombinanten Plasmide zu erleichtern, wurde eine zusätzliche Spaltstelle für HincII in die Sequenz eingeführt.

Abbildung 27 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten doppelsträngigen Oligonukleotide im Vergleich. Das Plasmid pBN4411 enthält also 20 bp, das Plasmid pBN4311 14 bp des gesamten URS-Elements. Der Abstand zwischen dem Transkriptionsstartpunkt und dem verkürzten URS-Element ist in beiden Fällen 120 bp (wie in pBN411).

Expression von fdhF'-lacZ:

Die fdhF'-lacZ Expression der Plasmide pBN4311 und pBN4411 wurde nach Transformation in den Stamm FM911 untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengestellt.

14 Basenpaare des URS-Elements reichen demnach aus, um ungefähr 65 % Aktivierung des fdhF-Promotors unter anaeroben Bedingungen mit Formiat zu erhalten. Die fdhF'-lacZ Expression ist auch in diesen Varianten unter aeroben sowie unter anaeroben Bedingungen mit Nitrat "reprimiert".

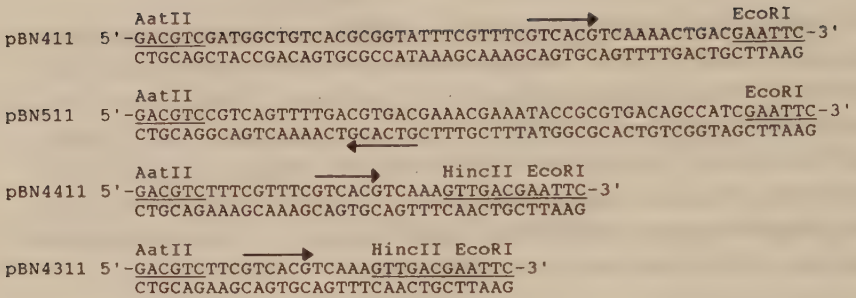


Abbildung 27:

Sequenz der klonierten doppelsträngigen Oligonukleotide

Tabelle 20: Aktivierung von fdhF'-lacZ mit verkürzten URS-Elementen

Plasmid ^b	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)				
	Glukose ^a (anaerob)	Glukose 30mM Formiat (anaerob)	Glukose 10mM Nitrat (anaerob)	Glukose (aerob)	Glukose 30mM Formiat (aerob)
pBN411 (Wildtyp)	427	2 839	96	41	56
pBN4311	230	1 916	48	24	30
pBN4411	153	1 417	57	21	20

a: Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5)

b: Plasmidrezipient war in allen Fällen E. coli FM911

Zusammenfassung:

- a) Im 5' flankierenden Bereich des fdhF Gens befindet sich an Position -110 (+1: Transkriptionsstart) ein cis-regulatorisches DNA Element (sogenanntes URS-Element), das für die anaerobe Aktivierung des fdhF Promotors mit Formiat essentiell ist.
- b) Die minimale Länge des gesamten Kontrollelements beträgt ungefähr 34 Basenpaare.
- c) Das URS-Element des fdhF Gens besitzt "enhancer"-ähnliche Eigenschaften: Funktionsfähigkeit in inverser Orientierung und in 2 kb Abstand zum fdhF Promotor.
- d) Der Abstand zwischen Transkriptionsstartpunkt und URS-Element ist entscheidend für die Promotoraktivierung: eine Vergrößerung des Abstands um 10 Basenpaare (eine Windung der DNA Helix) hat keinen Einfluß auf die Aktivierung (pBN411).
- e) Das Einführen von Mutationen im URS-Element bewirkt eine Reduzierung der fdhF'-lacZ Induktion, hat aber keinen Einfluß auf die "Sauerstoff-" und "Nitratkontrolle".

XI. Konstruktion und Analyse eines Promotorhybrids zwischen dem tac-Promotor und der fdhF Promotorregion

Die im letzten Kapitel erläuterten Ergebnisse weisen daraufhin, daß das URS-Element in der fdhF Kontrollregion eine Erkennungsstelle für ein DNA-bindendes Protein darstellt, das zumindest für die Formiatinduktion essentiell ist. Der Mechanismus der "Repression" der fdhF'-lacZ Expression in Anwesenheit von Sauerstoff und Nitrat (anaerob) stellt daher unter Umständen einen getrennt zu sehenden Effekt dar. In diesem und in folgenden Kapiteln der vorliegenden Arbeit wurde deswegen versucht, Aussagen darüber zu erhalten, ob in der fdhF 5' flankierenden Region zwischen URS-Element und Promotor eventuell Bindestellen für Repressoren vorhanden sind, die für die beobachteten Repressionsphänomene verantwortlich sein können.

In einem ersten Ansatz wurde dieses Problem mit Hilfe eines Promotorhybrids angegangen. Dabei wurde das EcoRI/SalI Fragment aus dem Plasmid pBN211 (Abbildung 6) mit der fdhF'-lacZ Fusion in den Expressionsvektor pJF118EH (63) inseriert. Das erhaltene, rekombinante Plasmid pBN211tac enthielt den starken tac-Promotor (5, 49) 5' zur fdhF Kontrollregion (ohne URS-Element).

Die Kinetik der β -Galaktosidase Induktion nach IPTG-Zugabe wurde nach Transformation dieses Plasmids in den Stamm FM911 untersucht. Nach aerober beziehungsweise anaerober Anzucht von FM911/pBN211tac bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 wurde 1 mM IPTG zugesetzt. Nach verschiedenen Zeiten wurden Kulturproben entnommen und deren spezifische β -Galaktosidase Aktivität ermittelt.

Abbildung 28 zeigt den Verlauf der Enzyminduktion. Festzuhalten bleibt, daß die durch den tac-Promotor gesteuerte fdhF'-lacZ Aktivierung unter aeroben und unter anaeroben Bedingungen vergleichbar gut funktioniert. Das gibt einen ersten Hinweis darauf, daß (zumindest bei Fehlen des fdhF-spezifischen URS-Elements) bei aerober Anzucht vermutlich kein(e) "Repressormolekül(e)" im fdhF Promotorbereich binden und auf diese Weise die Transkription

blockieren; diese "Repressoren" sollten im Fall von pBN211tac auch die vom tac-Promotor gesteuerte Transkription behindern und als Folge davon eine reduzierte Enzymexpression unter aeroben Bedingungen bewirken.

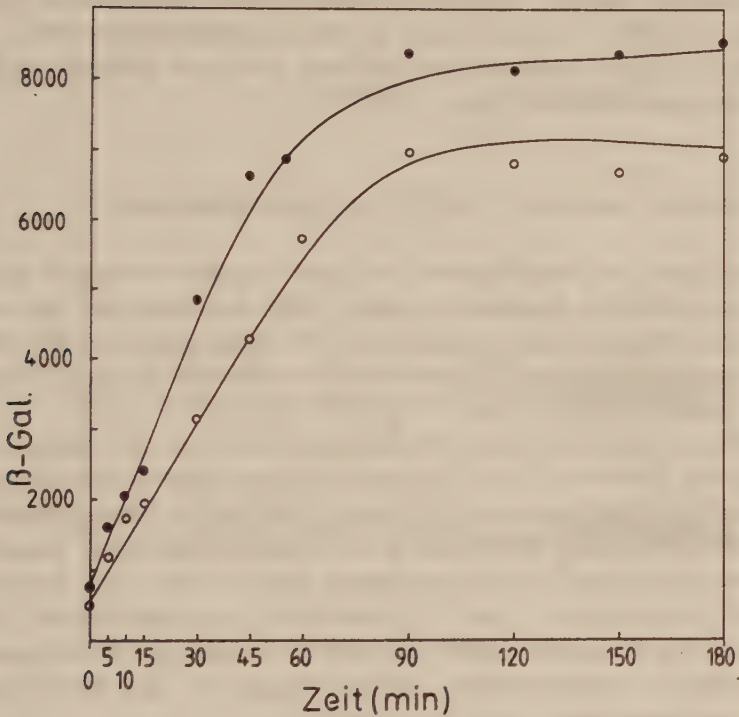


Abbildung 28:

Induktion von fdhF'-lacZ mit IPTG in FM911/pBN211tac

Anzucht in TGYEP-Medium (pH 6,5): ● aerob, ○ anaerob;

Zeitpunkt 0: Zugabe von 1 mM IPTG

XII. Konstruktion und Analyse einer $nifH_B \sim fdhF'$ - $'lacZ$ Hybridfusion mit dem UAS-Element von $nifH_B$ und dem $fdhF$ -Promotor

Alle bisher bekannten und gut untersuchten NTRA (σ^{54}) abhängigen Promotoren werden durch Proteine, die an URS- (oder UAS-) Elemente binden, positiv reguliert. Bekannte Beispiele sind die nif -Promotoren aus verschiedenen Organismen (3, 21, 32) und der $glnALG$ Promotor aus *E. coli* (151) sowie deren Aktivierung durch NIFA und/oder NTRC. Im folgenden wurde die Frage untersucht, ob die Regulator-(URS)-Elemente dieser Gene und ihre Spezifität für Aktivatoren austauschbar sind.

1. Konstruktion von $nifH_B \sim fdhF'$ - $'lacZ$ Hybridfusionen

Zuerst wurde das URS-Element der $fdhF$ Regulationsregion gegen das entsprechende Regulatorelement (NIFA Bindestelle) des $nifH$ Gens aus *Bradyrhizobium japonicum* (64) ausgetauscht. Die Klonierungsstrategie des entsprechenden Konstrukts zeigt Abbildung 29.

Das Plasmid pRJ6011 wurde freundlicherweise von M. Gubler zur Verfügung gestellt (71). Es enthielt die beiden UAS-Elemente des $nifH_B$ Gens, kloniert zwischen den beiden Multilinkerregionen des Vektors pUC4-KIXX (13). Das 180 bp *EcoRI* Fragment aus pRJ6011 wurde in die singuläre *EcoRI* Stelle des Plasmids pBN211 (Abbildungen 6 und 7) inseriert. Die erhaltenen, rekombinanten Plasmide (pBN70 und pBN71) tragen die UAS-Elemente von $nifH_B$ in verschiedenen Orientierungen 5' zum $fdhF$ -Promotor (Abbildung 29).

2. β -Galaktosidase Aktivität der $nifH_B \sim fdhF'$ - $'lacZ$ Hybride

Die so konstruierten Plasmide pBN70 und pBN71 wurden jeweils, zusammen mit dem kompatiblen Plasmid pMC71A, in den Stamm FM911 transformiert.

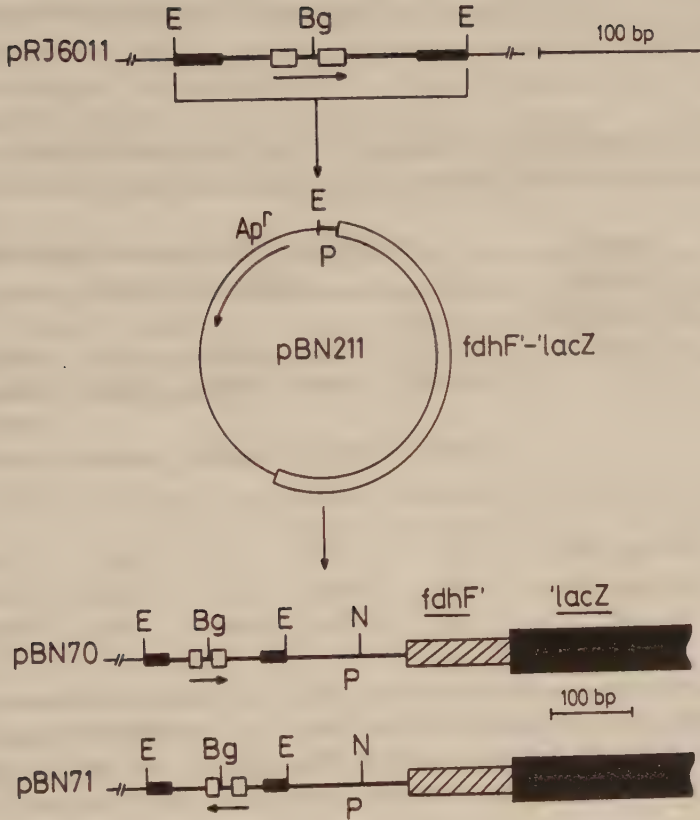


Abbildung 29:

Konstruktion der $nifH_B \sim fdhF' - lacZ$ Hybridfusionen

- UAS-Element von $nifH_B$
- Orientierung des UAS-Elements wie in der $nifH_B$ -Kontrollregion, ← inverse Orientierung des UAS-Elements
- Multilinker von pUC4-KIXX
- p: fdhF Promotor

Das Plasmid pMC71A (30) trägt das $nifA_K$ -Gen aus *Klebsiella pneumoniae*; die $nifA_K$ -Expression steht dabei unter der Kontrolle des Tet-Promotors im Vektor pACYC184 (konstitutive Expression von $nifA_K$).

Tabelle 21: NIFA-abhängige Aktivierung der $nifH_B \sim fdhF'$ - $'lacZ$ Hybride

Plasmid ^a	Abstand ^b zwischen UAS-Elementen und -12 Motiv	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)				
		-NIFA	+NIFA ^d	-NIFA	+NIFA	+NIFA
		Glukose ^c	Glukose	Glukose	Glukose	Glukose
		(aerob)	(aerob)	(anaerob)	(anaerob)	(anaerob) 10mM Nitrat
pBN70	180 bp, 209 bp	39	2 707	52	1 761	n.b.
pBN71	166 bp, 195 bp	14	6 069	35	6 868	n.b.
pBN211	- ^e	66	1 000	62	725	789

a: Plasmidrezipient war in allen Fällen FM911; b: Abstandsberechnungen nach Buck et al. (32); c: Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5) bei 28°C; d: Plasmid pMC71A ($nifA_K$) (30); e: Plasmid ohne UAS-Element; n.b.: nicht bestimmt

Tabelle 21 zeigt die NIFA-abhängige Aktivierung der $fdhF'$ - $'lacZ$ Hybridfusionen anhand der β -Galaktosidase Enzymaktivitäten. Folgende Schlüsse lassen sich daraus ableiten:

- Die Expression von $nifH_B \sim fdhF'$ - $'lacZ$ ist unter aeroben und anaeroben Bedingungen von der Gegenwart eines funktionellen NIFA Proteins abhängig.
- Die Aktivität der von $fdhF'$ - $'lacZ$ kodierten β -Galaktosidase von pBN70 unterscheidet sich stark von der von pBN71. Da

die beiden Plasmide nur in der Orientierung des $nifH_B$ UAS-Elements differieren, und da die für die NIFA Erkennungsstelle wichtigen Sequenzmotive symmetrische DNA-Elemente darstellen (32), ist die Ursache für die unterschiedliche Expression wahrscheinlich in dem verschiedenen Abstand zwischen UAS-Elementen und Promotor zu suchen. Die Bedeutung dieses Abstands für die NIFA-abhängige Aktivierung von nif -Promotoren wurde bereits gezeigt (32, 33).

- c) Der $fdhF$ Promotor wird auch ohne NIFA-spezifisches UAS-Element durch das NIFA Protein von *Klebsiella pneumoniae* aktiviert (pBN211). Diese Aktivierung kann auch unter aeroben und unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Nitrat stattfinden.

XIII. NIFA- und NTRC-abhängige Aktivierung von fdhF'-'lacZ

Der NTRA-abhängige fdhF-Promotor kann nach den in Tabelle 21 präsentierten Daten durch das NIFA_K Protein von Klebsiella pneumoniae (zumindest wenn das nifa_K-Gen in erhöhter Gendosis vorliegt) auch in Abwesenheit spezifischer UAS-Elemente aktiviert werden. Für andere NTR-regulierte Promotoren wurden analoge Beobachtungen beschrieben: so kann das NIFA_K Protein in mehreren Systemen das ntrC-Genprodukt ersetzen (125, 138, 139, 169). Die Aktivierung von NTRA-abhängigen Promotoren durch die Regulatorproteine NIFA und NTRC bei Fehlen der UAS-Elemente wurde mit einem direkten Einfluß von NIFA oder NTRC auf den RNA-Polymerase- σ^{54} -Komplex erklärt (32, 46, 71, 151, 202).

1. NIFA-abhängige Aktivierung von fdhF'-'lacZ

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, welche Teile der 5' flankierenden DNA-Sequenz des fdhF-Gens für die Aktivierung durch NIFA entscheidend sind. Dazu wurde der Stamm FM911, transformiert mit einer Reihe von Bal31-Deletionsplasmiden (pBN210-pBN215) (Abbildung 7) und dem kompatiblen Plasmid pMC71A (nifa_K) (30), unter aeroben und anaeroben Bedingungen angezogen; anschließend wurde die β -Galaktosidase Aktivität bestimmt; Abbildung 30 gibt die Enzymaktivitäten der einzelnen Stämme wieder.

In Abwesenheit von NIFA findet man das erwartete, bereits früher beschriebene Regulationsmuster für die fdhF'-'lacZ Expression. Einführen des nifa_K-Gens in erhöhter Gendosis bewirkt dann jedoch eine konstitutive, aerobe Synthese von β -Galaktosidase in Höhe von etwa 1.000 Einheiten in allen 5' Deletionsklonen. In Gegenwart des fdhF-eigenen URS-Elements und des NIFA Proteins kann die Genexpression unter anaeroben Bedingungen dagegen ungefähr um das Dreifache gesteigert werden (pBN210: Position -142).

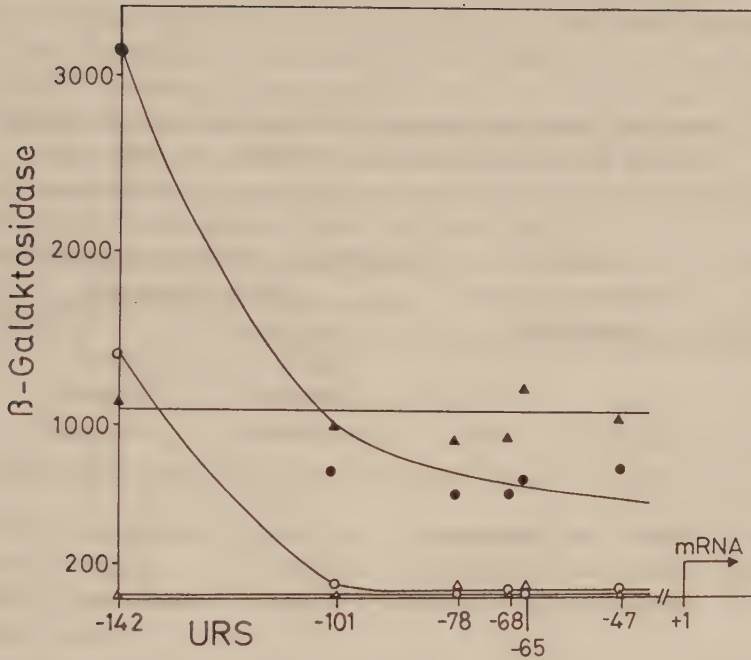


Abbildung 30:

NIFA-abhängige Aktivierung von *fdhF'*-*'lacZ* Fusionen

Expression von *fdhF'*-*'lacZ* in FM911 mit den Plasmiden pBN210 - pBN215 (siehe Abb. 7). URS: URS-Element von *fdhF*

Anzucht der Stämme in TGYEP-Medium (pH 6,5) bei 28°C.

- ▲ aerob, + NIFA (pMC71A)
- △ aerob, - NIFA
- anaerob, + NIFA (pMC71A)
- anaerob, - NIFA

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß eine Aktivierung des fdhF-Promotors durch direkte Interaktion des NIFA Proteins mit dem RNA Polymerase- σ^{54} -Komplex am Promotor erfolgen kann. Dieser Schluß wurde durch die in Tabelle 22 zusammengefaßten Ergebnisse bestätigt.

Tabelle 22: Bedeutung eines funktionellen fdhF-Promotors und des ntrA-Genprodukts für die NIFA-abhängige Aktivierung von fdhF'-lacZ

Stamm (relevanter Genotyp)	Plasmid (charakteristische Eigenschaft)	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)	
		-NIFA Glukose ^a (anaerob)	+NIFA ^b Glukose (anaerob)
FM911 (ntrA ⁺)	pBN211 (ohne URS-Element)	84	725
BN452 (Δ ntrA)	pBN211 (ohne URS-Element)	131	120
FM911 (ntrA ⁺)	pBN219 (ohne fdhF Promotor)	< 1	< 1

a: Anzucht in TGYEP-Medium (pH 6,5) bei 28°C

b: Plasmid pMC71A (nifA_K) (30)

2. NTRC-abhängige Aktivierung von fdhF'-lacZ

Das NTRC Protein ist ein weiteres, gut untersuchtes Regulatorprotein verschiedener NTRA-abhängiger Gene. Es wird unter Stickstoffmangel durch das ntrB-Genprodukt phosphoryliert, und kann nach dieser Modifikation die Transkription verschiedener Gene des NTR-Regulons stimulieren (135, 202). In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob dem NTRC Protein eine Bedeutung bei der Regulation der fdhF Expression zukommt.

Die nachfolgenden Versuche wurden in N-reichem Medium (GN) beziehungsweise N-Mangelmedium (Gg) durchgeführt (179). Zuerst wurde die Expression von verschiedenen fdhF'-lacZ Fusionen unter Stickstoffmangel (hoher zellulärer Spiegel an phosphoryliertem NTRC) getestet und anschließend wurde der Einfluß einer erhöhten Kopienzahl (Plasmid pMM14) (125) von ntrC_K (Gen aus Klebsiella pneumoniae) auf die fdhF'-lacZ Expression untersucht. Tabelle 23 faßt die Ergebnisse zusammen:

Tabelle 23: Aktivierung von fdhF'-lacZ durch NTRC

Plasmid(e) ^a	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)			
	GN ^c (aerob)	Gg ^c (aerob)	GN (anaerob)	Gg (anaerob)
pBN210 (+URS-Element)	110	2 148	490	516
pBN210, pMM14 ^b	1 126	2 447	1 986	1 656
pBN211 (-URS-Element)	227	2 297	346	351
pBN211, pMM14	1 053	2 479	797	1 267

a: Rezipient der Plasmide war E. coli FM911

b: pMM14 (ntrC_K) (125)

c: Anzucht in W-Medium (pH 7); GN: Glukose + 0,2 % (NH₄)₂SO₄; Gg: Glukose + 0,2 % Glutamin

Das NTRC Protein hat nach diesen Versuchen einen ähnlichen Effekt auf die Expression von fdhF wie das NIFA Protein (siehe XII.1.). In Anwesenheit des Plasmids pMM14 (ntrC_K) wird die fdhF'-lacZ Fusion unter aeroben wie unter anaeroben Bedingungen exprimiert. Dieser induzierende Effekt durch NTRC ist unter Stickstoffmangel (Gg) noch verbessert. Analog zur NIFA-

abhängigen Aktivierung ist die Induktion durch NTRC lediglich an das Vorhandensein eines funktionellen fdhF-Promotors gekoppelt und wird nicht durch eine ntrC-Bindestelle begünstigt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Ein unerwarteter Befund in dieser Serie von Experimenten war allerdings die Tatsache, daß unter speziellen Stickstoffmangelbedingungen (Gg), auch ohne erhöhte ntrC-Gendosis, in einem Wildtypstamm unter aeroben Bedingungen hohe Expression von fdhF'-lacZ nachgewiesen werden kann. Unter anaeroben Bedingungen hat Stickstoffmangel allerdings keinen Einfluß auf die fdhF'-lacZ Induktion.

Expression von fdhF in verschiedenen ntrC-Mutanten:

Die im letzten Abschnitt erläuterten Versuchsergebnisse deuteten zwar daraufhin, daß dem ntrC-Genprodukt keine Rolle bei der "anaeroben Induktion" der fdhF-Transkription zukommt; dieser Befund sollte aber durch Untersuchung verschiedener ntrC-Mutanten erhärtet werden.

Die Mutante E. coli GP8047 (ntrC = glnG) mit einer Tn5-Insertion im ntrC-Gen und die Mutante YMC15 mit einer Punktmutation im ntrB-Gen (glnL302 Allel) wurden im Labor von Dr. B. Magasanik isoliert und gut charakterisiert (41, 156). Die beiden Mutanten wurden in dieser Arbeit auf ihre Fähigkeit zur Gasbildung hin überprüft. Mit Hilfe dieses Tests konnte im Vergleich zum Wildtypstamm kein Unterschied in der Aktivität des Formiathydrogenlyase (FHL) Enzymkomplexes festgestellt werden.

Im weiteren wurde die FHL Enzymaktivität beziehungsweise die Expression von fdhF'-lacZ noch in verschiedenen ntrC-Deletionsmutanten überprüft. Es konnte gezeigt werden, daß die Regulation der fdhF'-lacZ Expression auch in den Mutanten ET8894 (Δ glnALG) (120) und ET6016 (Δ glnLG) wie im Wildtyp ablaufen kann.

Zufällig wurde bei der Analyse der Deletionsmutanten ET6017, ET6018 (Δ glnALG) aber entdeckt, daß im E. coli Chromosom,

ungefähr bei Minute 86 (zwischen *glnG* und *metE*), ein Genort lokalisiert sein muß, der für die Aktivität des Formiathydrogenlyase-Komplexes essentiell ist. Die beiden Mutanten besitzen eine Deletion unbekannter Größe zwischen dem *rha*-Operon (87,7') und dem *glnALG*-Operon (86,7') und haben einen Gasnegativen Phänotyp. Dieser Defekt konnte auch nicht durch das Cosmid pFMcos1 (*glnALG*⁺) komplementiert werden, das die gesamte Region zwischen dem *rha*-Operon und dem *glnALG*-Operon enthält. Das bedeutet, daß die Deletion in den Mutanten ET6017 und ET6018 auch noch Genorte bei Minute 86 zwischen den Genen *glnG* und *metE* erfaßt. Möglicherweise ist einer dieser Genorte für die Aktivität des Formiathydrogenlyase-Komplexes notwendig.

XIV. Konstruktion und Analyse von chimären fdhF (URS) ~ nif'-lacZ Fusionen mit dem URS-Element von fdhF und verschiedenen nif-Promotoren

Die bisher geschilderten Ergebnisse stehen im Einklang mit der Hypothese, daß das URS-Element die Transkriptionskontrolle des fdhF-Gens (also "Induktion" und "Repression") dadurch determiniert, daß es als Bindestelle für ein (oder mehrere) Regulatorprotein(e) fungiert. Im folgenden wurde nun versucht, diese Annahme durch die Analyse von hybriden Kontrollregionen zwischen dem URS-Element von fdhF und verschiedenen nif-Promotoren zu überprüfen.

1. Klonierungsstrategie

Vier verschiedene nif-Promotoren wurden für die Konstruktion der Hybride verwendet: der nifD_B Promotor aus Bradyrhizobium japonicum und die Promotoren von nifH_K, nifU_K und nifB_K aus Klebsiella pneumoniae. Die entsprechenden Plasmide wurden freundlicherweise von H. Hennecke und M. Buck zur Verfügung gestellt.

Abbildung 31 zeigt die für die Herstellung der fdhF (URS) ~ nifD_B'-lacZ Fusion notwendigen Schritte. Zuerst wurde das 190 bp RsaI/BamHI Fragment aus dem Plasmid pRJ1008 (nifD_B'-lacZ) (4) in die Multilinkerregion des Vektors pUC19 (137) inseriert. Im Anschluß daran wurde aus dem erhaltenen rekombinanten Plasmid das EcoRI/BamHI Fragment isoliert und in den lac-Fusionsvektor pMC1403 (36) kloniert. Das Plasmid pBN100 enthält also die nifD_B'-lacZ Fusion ohne "nif"-spezifisches UAS-Element in der 5' flankierenden Region. Wie in Abbildung 31 gezeigt, war pBN100 das Ausgangsplasmid für die Klonierung des Hybrides. Dafür wurde das EcoRI/SalI Fragment mit der nifD_B'-lacZ Fusion aus pBN100 mit dem EcoRI/SalI Vektorfragment aus pBN4 (siehe Abbildung 24) ligiert.

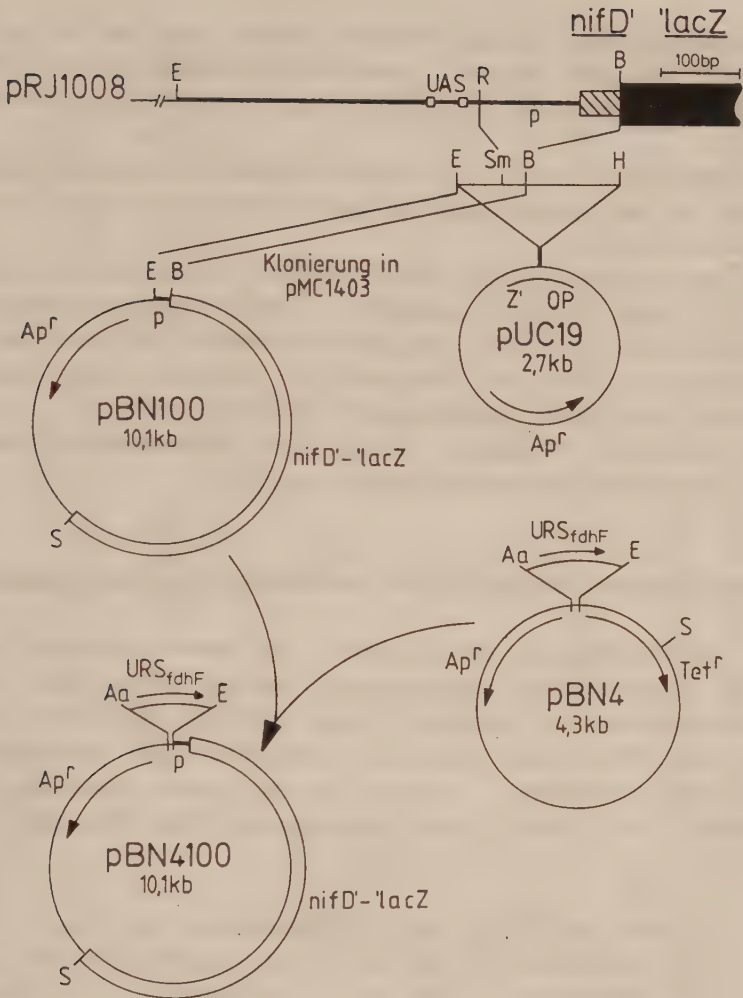


Abbildung 31:

Klonierungsstrategie für die Plasmide pBN100 und pBN4100

- UAS-Element des nifD_B-Gens
- URS_{fdhF}: URS-Element von fdhF
- p: nifD_B-Promotor

Das rekombinante Plasmid pBN4100 enthält also das 40 bp URS-Element von *fdhF* 109 bp 5' zum Transkriptionsstart des *nifD_B*-Gens (zum Vergleich: URS-Element im *fdhF* Wildtyp an Position -110).

Die *fdhF*(URS)~*nifH_K*'-'lacZ Fusion (pBN4400) wurde in analoger Weise wie das Plasmid pBN4100 aus den Plasmiden pSMM4 (32) und pBN4 hergestellt.

Für die Konstruktion der *fdhF*(URS)~*nifU_K*'-'lacZ und *fdhF*(URS)~*nifB_K*'-'lacZ Fusionen (pBN4900, pBN4161) wurden *EcoRI*/*ClaI* Fragmente aus pSMM9 beziehungsweise pSMM161 (32) mit den entsprechenden *nif*'-'lacZ Fusionen mit dem *EcoRI*/*ClaI* Vektorfragment aus pBN411 (Abbildung 24) kombiniert.

Die klonierten Fragmente aller hier beschriebenen Plasmide wurden mittels DNA Sequenzierung überprüft.

2. β -Galaktosidase Aktivität der *fdhF*(URS)~*nif*'-'lacZ Hybride

Die verschiedenen Hybridkonstrukte und deren Vorläufer (*nif*'-'lacZ Fusionen ohne URS-Elemente) wurden in *E. coli* FM911 transformiert; im Anschluß daran wurde die β -Galaktosidase Aktivität der Transformanten nach Anzucht unter verschiedenen Bedingungen ermittelt. Tabelle 24 faßt diese Experimente zusammen. Sie ergaben einige Überraschende und interessante Befunde:

- a) Von allen getesteten vier *nif*-Promotoren läßt sich nur der *nifH_K*-Promotor durch das 40 bp URS-Element von *fdhF* spezifisch regulieren. Dabei wird das gesamte, für *fdhF* typische Regulationsmuster auf *nifH_K*'-'lacZ übertragen. Das bedeutet in erster Linie Induzierbarkeit durch Formiat (anaerob), aber auch Reprimierbarkeit durch Sauerstoff oder Nitrat (anaerob).
- b) Die *nifD_B*, *nifU_K* und *nifB_K* Fusionen dagegen sind nicht regulierbar durch das *fdhF*-spezifische URS-Element, und man findet keinen Unterschied in der Expression zwischen den *nif*'-'lacZ Derivaten ohne jedes URS-Element und den

Tabelle 24: Regulation der Hybridpromotoren

Plasmid ^a	URS-Element (Abstand) ^b	Fusion	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)					
			Glucose ^c (aerob)	Glucose 30mM Formiat (aerob)	Glucose (anaerob)	Glucose 30mM Formiat (anaerob)	Glucose 10mM Nitrat (anaerob)	
pBN100	-	nif ⁺ _B '-'lacZ	5	12	12	62	37	
pBN4100	+ (109 bp)	nif ⁺ _B '-'lacZ	< 1	31	< 1	24	< 1	
pSM44	-	nif ⁺ _K '-'lacZ	15	15	< 1	< 1	n.b.	
pBN4400	+ (101 bp)	nif ⁺ _K '-'lacZ	< 1	< 1	147	718	< 1	
pSM49	-	nif ⁺ _K '-'lacZ	116	117	114	170	n.b.	
pBN4900	+ (121 bp)	nif ⁺ _K '-'lacZ	72	79	105	164	n.b.	
pSM161	-	nif ⁺ _K '-'lacZ	< 1	< 1	< 1	< 1	n.b.	
pBN4161	+ (132 bp)	nif ⁺ _K '-'lacZ	< 1	< 1	< 1	< 1	n.b.	

a: Rezipient der Plasmide war FW911

b: Bezugspunkt für die Abstandsberechnungen: siehe * in Abbildung 22

c: Anzuchten in TGYEP-Medium (pH 6,5)

n.b.: nicht bestimmt; Indizes B und K: Gene aus *Bradyrhizobium japonicum* beziehungsweise *Klebsiella pneumoniae*

Hybridkonstruktionen. Der Grund für dieses Ergebnis ist bisher ungeklärt. Auf alle Fälle können aber ungünstige Abstände zwischen dem URS-Element und den verschiedenen Promotoren als alleinige Ursache dafür ausgeschlossen werden, denn zumindest in der $fdhF(URS) \sim nifD_B$ -'-lacZ Fusion ist dieser Abstand mit 109 bp nahezu ideal (110 bp im Wildtyp).

In einer abschließenden Versuchsreihe wurde die Regulation des $fdhF(URS) \sim nifH_K$ -'-lacZ Hybrids noch genauer untersucht. Damit sollte die wichtige Frage beantwortet werden, welche der bekannten Faktoren, die die $fdhF$ -Transkription beeinflussen, das URS-Element in der 5' flankierenden DNA Region des $fdhF$ -Gens benötigen. Dieselben Faktoren sollten demzufolge auch das Hybrid regulieren.

Von V. Schlensog war eine Regulationsmutante (SV51) mit einer λ placMu53 Insertion wahrscheinlich im $chlD$ Locus isoliert worden. In dieser Mutante konnte $fdhF$ -'-lacZ nur in Anwesenheit hoher Mengen Molybdat ($100 \mu M$) unter anaeroben Bedingungen gut exprimiert werden. Erstaunlicherweise konnte ein ähnlicher stimulierender Effekt auf die Expression des Fusionsproteins auch durch die Zugabe von 1 mM Wolframat erzielt werden (168).

Mit Hilfe des isolierten Hybrids konnte jetzt untersucht werden, ob der, in seinem Mechanismus bislang ungeklärte, stimulierende Einfluß von Molybdän auf die $fdhF$ -Transkription über den/die gleichen Faktor(en) ausgeübt wird, die das cis-regulatorische URS-Element erkennen. In diesem Fall sollte Molybdän auch die Transkription von $fdhF(URS) \sim nifH_K$ -'-lacZ aktivieren. Tatsächlich konnte dieser Effekt nach Transformation von pBN4400 in die Mutante SV51 und Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität nachgewiesen werden (Tabelle 25). Auch die Stimulierung der Genexpression durch Wolframat ließ sich bestätigen.

Weiterhin wurde überprüft, ob der im Rahmen dieser Arbeit (Kapitel IX) gefundene Effekt von Dipyridyl auf die $fdhF$ -Expression in gleichem Maße für $fdhF(URS) \sim nifH$ -'-lacZ gilt. Wie die in Tabelle 25 zusammengestellten Resultate demonstrieren

ren, ist die Expression der Hybridfusion pBN4400 unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Dipyridyl ebenso wie die der Wildtypfusion (pBN208) auf ungefähr 6 % reduziert.

Tabelle 25: Eigenschaften der fdhF(URS)~nifH_K'-'lacZ Hybridfusion (pBN4400)

Stamm	Spezifische β -Galaktosidase Aktivität (Miller Einheiten)				
	TGYEP ^b 100 μ M MoO ₄ ²⁻ (anaerob)	TGYEP ^b 1mM WoO ₄ ²⁻ (anaerob)	TGYEP ^b 30mM Formiat (anaerob)	TGYEP 30mM Formiat 200 μ M Dipyridyl (anaerob)	TGYEP (anaerob)
SV51 ^a (pBN208) (fdhF'-'lacZ)	404	1 302	1 128	n.b.	n.b.
SV51 (pBN4400) (fdhF~nifH _K '-'lacZ)	< 1	71	137	n.b.	n.b.
FM911 (pBN208) (fdhF'-'lacZ)	n.b.	n.b.	n.b.	3 053	183
FM911 (pBN4400) (fdhF~nifH _K '-'lacZ)	n.b.	n.b.	n.b.	681	43

a: SV51 (chlD:: λ placMu53) (168); b: Anzucht anaerob in TGYEP-Medium (pH 6,5) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4; anschließend Zugabe von 30 mM Formiat (1,5 h) und Enzymtest; n.b.: nicht bestimmt; Index K: Gen aus Klebsiella pneumoniae

Mit diesen Experimenten wurde eindeutig nachgewiesen, daß die Transkription des fdhF(URS)~nifH_K'-'lacZ Hybrids identisch reguliert wird wie die Transkription von fdhF. Das bedeutet aber, daß das URS-Element der fdhF 5' flankierenden Region alle be-
kannten Regulationsphänomene vermittelt.

D I S K U S S I O N

Die Formiatdehydrogenase H (FDH_H) von *Escherichia coli* wird als Bestandteil des Formiathydrogenlyase Komplexes ausschließlich unter Gärungsbedingungen gebildet. Die Synthese des 80 kDa Selenopolypeptids (Strukturgen *fdhF*) wird auf der Ebene der Transkription reguliert (23, 143, 204): einerseits ist die *fdhF*-Expression unter anaeroben Bedingungen induzierbar durch Formiat, andererseits wird die Transkription aber in Gegenwart von Nitrat, Nitrit, Trimethylamin-N-oxid, Fumarat (anaerob) und Sauerstoff als externe Elektronenakzeptoren reprimiert. Die Aufklärung der beteiligten Regulationsmechanismen stellt ein interessantes physiologisches Problem dar, denn zum einen kann an diesem Beispiel das Phänomen der "anaeroben Induktion" der Genexpression untersucht werden, zum anderen aber eröffnen die komplexen Repressionsphänomene auch die Möglichkeit, die Frage nach der Existenz einer "Redoxkontrolle" anaerober Enzyme (nach dem Modell von Wimpenny and Cole (199)) anzugehen.

In dieser Arbeit wurde ein molekularbiologischer Ansatz gewählt, um durch die Identifizierung und Charakterisierung des *fdhF*-Promotors und zusätzlicher regulatorischer Elemente, Hinweise auf den Mechanismus der Regulation zu erhalten. Wesentliche Ergebnisse dieser Experimente waren:

- a) Die *fdhF*-Transkription ist unabhängig vom *fnr*-Genprodukt.
- b) Das *fdhF*-Gen hat keinen -10/-35 Konsensuspromotor, sondern einen -12/-24 ("nif") Promotor.
- c) Essentiell für die Steuerung der *fdhF*-Transkription ist ein "enhancer"-ähnliches, cis-regulatorisches DNA-Element.

Der *fdhF* Promotor ist somit der erste detailliert analysierte, FNR-unabhängige Promotor eines anaerob induzierten Strukturgens von *E. coli*.

Einfluß von Selen auf die Regulation der fdhF-Transkription

Das Spurenelement Selen hat einen entscheidenden Einfluß auf die Biosynthese des fdhF-Genprodukts. Ein TGA-(Stopp)-Kodon an Aminosäureposition 140 kodiert in seiner speziellen genetischen Umgebung für die seltene Aminosäure Selenocystein (142, 210, 211). Durch einen hochspezifischen Mechanismus wird der cotranslationale Einbau dieser Aminosäure bewerkstelligt. Dazu sind nach jetzigen Erkenntnissen eine Reihe von Komponenten erforderlich: die Produkte der Gene selA, B, und D (109), eine spezielle supprimierende tRNA (selC) (110) und 0,1 bis 0,2 μM Na_2SeO_3 im Anzuchtmedium (Abbildung 4).

Aus diesen Befunden ergibt sich die interessante Fragestellung, ob Selen möglicherweise nicht nur für die Translation der fdhF mRNA, sondern auch für die fdhF Transkription einen entscheidenden Effektor darstellt. Zwei Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen eindeutig, daß in vivo die Transkription des fdhF-Gens unabhängig vom Selenangebot im Kulturmedium erfolgt:

- a) fdhF'-lacZ Proteinfusionen mit einem fdhF-Anteil 5' des TGA-Kodons werden auch unter Selenmangel voll exprimiert. Enthält das Fusionsprotein jedoch ein fdhF-Segment mit dem TGA-Kodon, kann unter Selenmangel nur unbedeutende β -Galaktosidase Aktivität nachgewiesen werden (Tabelle 6).
- b) Eine Northern Blot Analyse der fdhF'-lacZ Transkripte ergab, daß unter Selenmangel, wie unter Selenüberschuß, jeweils Transkripte identischer Größe nachgewiesen werden können. Dieser Befund bestätigt, daß lediglich die Translation der fdhF mRNA, nicht aber die fdhF-Transkription von Selen abhängig ist. Die Menge an fdhF'-lacZ mRNA ist nach den in Abbildung 5B präsentierten Versuchsergebnissen in den Anzuchten ohne Selen zwar etwas geringer als in Anzuchten mit Selen. Dieses Phänomen ist aber sehr wahrscheinlich auf einen erhöhten Abbau der fdhF'-lacZ mRNA durch die Entkoppelung von Translation und Transkription unter Selenmangel zurückzuführen. Nach einem in der Literatur vielfach beschriebenen

Modell wird durch eine solche Entkoppelung die mRNA nicht mehr durch translatierende Ribosomen geschützt und ist demzufolge sensibler gegenüber Abbau durch RNasen (72, 81, 170).

Aus dem Ergebnis der Northern Blot Analyse kann weiterhin gefolgert werden, daß es in Abwesenheit von Selen offenbar nicht zu einer, theoretisch denkbaren, vorzeitigen Termination der fdhF-Transkription in der Umgebung des TGA-Kodons kommt, denn in diesem Fall sollte nach selenfreier Anzucht ein verkürztes fdhF-Transkript nachweisbar sein. Ein eindeutiger Beweis dafür konnte erst mit einer Reihe von fdhF'-lacZ Operonfusionen erbracht werden. Die Expression der β -Galaktosidase von solchen Operonfusionen steht unter der Kontrolle des fdhF-Promotors. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten Translationsfusionen (fdhF'-lacZ) wird hier aber kein Fusionsprotein gebildet, sondern die Translation terminiert am 3' Ende des fdhF-Anteils und reinitiiert am ATG-Kodon von lacZ (eigene Ribosomenbindestelle vor lacZ). Stämme mit derartigen fdhF'-lacZ Operonfusionen bilden β -Galaktosidase unabhängig vom Vorhandensein des TGA-Kodons im fdhF Anteil und unabhängig vom Selenangebot im Kulturmedium (F. Zinoni, persönliche Mitteilung).

Das fdhF-Gen hat einen NTRA-abhängigen Promotor

Die 5' flankierende Region des fdhF-Gens enthält keinen für E. coli typischen -10/-35 Konsensuspromotor (80). Überraschenderweise konnte allerdings eine -12/-24 Promotorsequenz im korrekten Abstand zum Transkriptionsstart identifiziert werden; mit Hilfe von lokalisierter Mutagenese konnte die Bedeutung der -12/-24 Konsensusmotive auch nachgewiesen werden (Kapitel VI). Derartige Konsensusэлеmente wurden ursprünglich für nif-Promotoren beschrieben (4, 7, 73). Auch andere Gene und Operone, die zu dem NTR-Regulon gerechnet werden, wie zum Beispiel das glnALG-Operon (150), haben einen -12/-24 Promotor. Wie an mehreren Beispielen in den letzten Jahren deutlich wurde, ist dieser Promotortyp aber nicht ausschließlich auf NTR-regulierte Gene beschränkt. So haben das xyl-Operon von Pseudomonas putida (52), das dctA-Gen (C4-Di-

carbonsäure Transport) von *Rhizobium leguminosarum* (152) und das Gen für Carboxypeptidase G2 von *Pseudomonas putida* (131) ebenso einen funktionellen -12/-24 Promotor.

Die Initiation der Transkription an einem -12/-24 Promotor ist abhängig von dem alternativen Sigmafaktor σ^{54} (NTRA), der die Erkennungsspezifität der RNA Polymerase verändert (82, 85). Wie daher zu erwarten war, ist die Transkription des *fdhF*-Gens vollkommen abhängig vom *ntrA*-Genprodukt (Kapitel VI). Nach allen jetzt verfügbaren Daten wird die Expression von *fdhF* aber nicht von den übrigen Regulatorproteinen des NTR-Regulons (*ntrB*, *ntrC*) kontrolliert (Kapitel XIII.2.)

Hydrogenase 3 Enzymtests in *ntrA*-Mutanten ergaben den eindeutigen Befund, daß die Expression dieses Gärungszyms ebenfalls von NTRA abhängig ist (24). Eine -12/-24 Promotorsequenz wurde im Anschluß daran vor einem Gen, das für die Hydrogenase 3 Bildung erforderlich ist, identifiziert (S. Lutz, persönliche Mitteilung).

Diese Ergebnisse werfen folgende wichtige Frage auf:

Gibt es noch andere anaerob induzierbare, NTRA-abhängige Gene und welche Bedeutung hat NTRA dementsprechend für die Regulation des gesamten anaeroben Stoffwechsels von *E. coli*?

Neben den beiden oben genannten Beispielen ist seit kurzem nur noch ein weiteres, anaerob induzierbares Gen bekannt, das den alternativen Sigmafaktor NTRA für seine Transkription benötigt: das *hydB*-Gen, das für die Bildung von aktiver Hydrogenase erforderlich ist (161). Alle übrigen untersuchten, anaerob induzierbaren Enzyme, wie Pyruvatformiatlyase, Formiatdehydrogenase, Hydrogenasen 1 und 2, Fumaratreduktase und Nitratreduktase sind NTRA-unabhängig, interessanterweise aber FNR-abhängig (24). Daraus läßt sich die Hypothese ableiten, daß es zumindest zwei Klassen anaerob regulierter Promotoren in *E. coli* geben könnte: zum einen FNR-abhängige, NTRA-unabhängige Promotoren und zum anderen NTRA-abhängige, FNR-unabhängige Promotoren. Möglicherweise existieren daher mindestens zwei verschiedene Mechanismen

der anaeroben Regulation. Nach der gängigen Ansicht ist das FNR Protein ein Transkriptionsaktivator, der "Aerobiose" oder "Anaerobiose" sensieren kann und dementsprechend die Expression FNR-abhängiger Gene unter anaeroben Bedingungen induziert (183). Das ntrA-Genprodukt wird in *E. coli* konstitutiv exprimiert (38) und ist unter aeroben wie anaeroben Wachstumsbedingungen als Sigmafaktor aktiv. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß die anaerobe Induktion von fdhF nicht durch den speziellen Sigmafaktor NTRA, sondern durch andere Faktoren ermöglicht wird.

Einen guten Hinweis auf die Bedeutung anderer Komponenten (neben NTRA) für die Transkriptionsregulation von fdhF liefert die in dieser Arbeit analysierte Plasmidmutante pBN314 (fdhF^{*}'-'lacZ) (Kapitel VIII). Die Analyse der Nukleotidsequenz dieser fdhF-Variante ergab, daß durch die Nitrosoguanidin-Mutagenese zusätzliche -10/-35 Konsensuspromotorelemente in der Promotorregion des fdhF-Gens entstanden waren.

Interessanterweise ließ sich die Expression von fdhF^{*}'-'lacZ in einer ntrA⁻ Mutante mit dem Plasmid pBN314 anaerob induzieren (9-fach) und durch Zugabe von Formiat auch noch weiter steigern (Tabelle 15). Daraus kann gefolgert werden, daß die charakteristische Eigenschaft des fdhF-Promotors - Induzierbarkeit unter anaeroben Bedingungen - nicht eine Folge des NTRA-abhängigen -12/-24 Promotors ist. Sofern (durch Mutation erzeugte) NTRA-unabhängige Promotoren wirksam werden können, wie im Fall von pBN314, läßt sich fdhF auch in Abwesenheit eines funktionellen ntrA-Genprodukts anaerob gut induzieren. Ein analoges Phänomen wurde von Reitzer et al. (149) für die Induktion einer glnALG-Promotor-Variante durch NTRC beschrieben.

Charakterisierung eines cis-regulatorischen DNA-Elements von fdhF (URS-Element)

Eine Gemeinsamkeit aller bisher bekannten NTRA-abhängigen Gene ist, daß für deren Expression zusätzliche Faktoren (DNA-bindende Proteine) notwendig sind. Im Fall der verschiedenen nif-Gene ist dieser Faktor das Aktivatorprotein NIFA (3, 21, 32), im Fall des

glnALG-Promotors von *E. coli* das NTRC Protein (151). Diese Gene haben in der 5' flankierenden Region eine Bindestelle für das jeweilige Aktivatorprotein. Die Bindestellen (URS- bzw. UAS-Elemente) befinden sich etwa 100 bis 150 bp 5' zum Transkriptionsstart, sie haben eine charakteristische Erkennungssequenz und weisen Eigenschaften auf, die eukaryontischen "enhancer"-Elementen ähnlich sind.

Wie in Kapitel X ausführlich dargelegt wurde, enthält die 5' flankierende Region des *fdhF*-Gens ebenfalls ein cis-regulatorisches DNA-Element, das genau diese genannten Eigenschaften aufweist. Es ist absolut notwendig für die Formiatinduktion des *fdhF*-Promotors und stellt die entscheidende strukturelle Komponente in der Kontrollregion für die Regulation der *fdhF*-Transkription dar (siehe unten). Bisher ist in *E. coli* kein Regulatorprotein bekannt, das an das identifizierte URS-Element binden und anschließend die *fdhF*-Transkription stimulieren kann. Es gibt aber eine Reihe von Argumenten, die sehr stark dafür sprechen, daß es sich bei diesem DNA-Element tatsächlich um eine Erkennungsstelle für ein DNA-bindendes Regulatorprotein handelt:

- a) Das URS-Element ist in verschiedenen Abständen zum Promotor wirksam. Wird dieser Abstand um $X \times 10$ bp (X = ganze Zahlen) verändert, ist die Funktion in der Transkriptionsaktivierung unbeeinträchtigt (10 bp = 1 Windung der DNA Doppelhelix).
- b) Wird das URS-Element näher als 87 bp an den Transkriptionsstart herangerückt, findet keine Aktivierung des Promotors mehr statt.
- c) Das URS-Element übt auch noch in mehr als 2 kb Distanz zum *fdhF*-Promotor seine Funktion in der Stimulierung der *fdhF*-Transkription aus.
- d) Das URS-Element bleibt auch in inverser Orientierung zum -12/-24 Konsensuspromotor funktionsfähig.

Aus diesen Ergebnissen ist zu folgern, daß bei Positionierung des URS-Elements im Promotor-proximalen Bereich der Distanz zwischen URS-Element und Promotor eine entscheidende Bedeutung zukommt. Erstens müssen die beiden Strukturelemente auf der gleichen Seite der DNA Doppelhelix lokalisiert sein und zweitens ist ein gewisser Mindestabstand zwischen den Elementen notwendig. Nach dem "DNA-loop" Modell von Ptashne (148) sind alle diese gefundenen Eigenschaften des cis-regulatorischen DNA-Elements charakteristisch für eine Regulatorbindestelle. Nach dieser Theorie müssen Regulatorproteine, die an Erkennungssequenzen in der 5' flankierenden Region eines Gens binden, mit Proteinen im Promotorbereich in Kontakt treten, damit eine Aktivierung der Transkription erfolgen kann. Dabei bilden dazwischenliegende DNA-Sequenzen eine Schleifenstruktur ("DNA-loop"). Ein effizienter Kontakt zwischen den verschiedenen Proteinen ist nach diesem Modell nur dann möglich, wenn sich deren Bindestellen auf der gleichen Seite der DNA Doppelhelix und in einem gewissen Mindestabstand befinden.

Nach den bisherigen Ergebnissen hat das URS-Element des *fdhF*-Gens eine Länge von ungefähr 35 bis 40 Basenpaaren. Welche der Nukleotide für die Funktion entscheidend sind und die eigentliche Kernsequenz der Bindestelle darstellen, ist bislang unbekannt. Diese ließen sich nur nach Mutanten- und Bindestudien zweifelsfrei angeben. Bei einer Analyse der Nukleotidsequenz im Bereich des URS-Elements wurde aber folgende Struktur entdeckt: in einem Abschnitt von nur 26 Basenpaaren befindet sich ein wiederholtes Sequenzmotiv - 5'-GTCACG-3' -. Die beiden Hexanukleotide sind durch 14 Basenpaare voneinander getrennt (Abbildung 32).

Möglicherweise enthält das URS-Element von *fdhF* also zwei (kooperative?) Bindestellen für ein bisher noch unbekanntes Regulatorprotein, in Tandemanordnung. Die im Laufe dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse aus Mutantenstudien liefern Hinweise für diese Hypothese:

- a) Eine Deletionsmutante ($\Delta 250$), die nur noch ein -GTCACG- Motiv enthält (Abb. 32), ist noch zu 50 % aktivierbar (Tabelle 19).

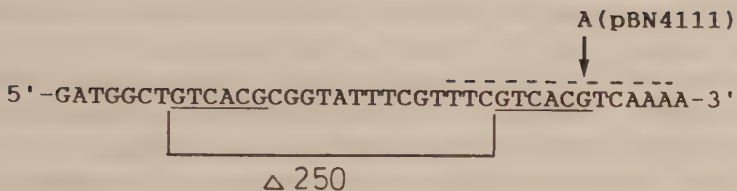


Abbildung 32:
Struktur des URS-Elements von fdhF

Unterstrichene Nukleotide: wiederholtes Hexanukleotid
↓ Punktmutation in der Mutante pBN4111
Δ 250: interne Deletion in der Mutante pBN250
--- Sequenz des verkürzten URS-Elements (pBN4311)

- b) Eine Punktmutante mit einem G → A Basenaustausch im zweiten Motiv (Abbildung 32) ist ebenfalls noch zu 50 % aktivierbar (Tabelle 19).
- c) Der fdhF-Promotor läßt sich mit einem verkürzten URS-Element, das nur noch 14 Basenpaare der Wildtypsequenz enthält (Abbildung 32), zu 65 % aktivieren (Tabelle 20).

Ein in diesem Zusammenhang ebenso wichtiger Befund ist weiterhin, daß in der 5' flankierenden Region eines Gens, das für die Hydrogenase 3 Bildung erforderlich ist und in identischer Weise wie fdhF reguliert wird, eine ähnliche Hexanukleotidsequenz gefunden wurde (27). In diesem Fall tritt das Sequenzmotiv aber nur einmal in der Promotorregion auf.

Ein Sequenzvergleich zwischen dem URS-Element von fdhF und den postulierten Bindestellen für NTRC (151), OMPR (136), FUR (50) und FNR (181) in E. coli ergab keine homologen Bereiche.

URS-Elemente aus verschiedenen Systemen sind austauschbar

Die Analyse von Genen mit hybriden Promotorbereichen ermöglicht genauere Aussagen über die Funktion und Bedeutung der einzelnen Regulatorelemente. Die in dieser Arbeit beschriebenen Hybride zeigen eindeutig, daß der für verschiedene NTRA-abhängige Promotoren jeweils charakteristische Aktivierungsmechanismus an das Vorhandensein des cis-regulatorischen URS-Elements gekoppelt ist und mit diesem auch auf andere Gene übertragen werden kann. So läßt sich eine *fdhF*-Variante mit einer NIFA-Bindestelle aus *Bradyrhizobium japonicum* in der 5' flankierenden Sequenz in *E. coli* durch NIFA aus *Klebsiella pneumoniae* aktivieren (Tabelle 21). Ebenso kann ein *nifH* Hybrid (*nifH* aus *Klebsiella pneumoniae*) mit dem -12/-24 Promotor von *nifH* und dem URS-Element von *fdhF* unter anaeroben Wachstumsbedingungen mit Formiat aktiviert werden (Tabelle 24). Mit Hilfe dieses *fdhF*(URS)~*nifH* Hybrids konnte außerdem der Beweis dafür erbracht werden, daß das URS-Element des *fdhF*-Gens die entscheidende strukturelle Komponente der regulatorischen Region für alle am *fdhF*-Gen bisher gefundenen Regulationsphänomene darstellt (Tabellen 24, 25):

- a) Induktion in Gegenwart von Formiat unter Anaerobiose;
- b) Repression in Anwesenheit von Sauerstoff beziehungsweise Nitrat (anaerob);
- c) Sensitivität gegenüber dem Chelatkomplexbildner Dipyridyl;
- d) Abhängigkeit der Transkription von der Anwesenheit von Molybdat im Medium.

Ein unerwartetes und bisher ungeklärtes Ergebnis lieferte die Analyse von Hybridkonstrukten zwischen dem URS-Element von *fdhF*- und anderen *nif*-Promotoren (*nifD* aus *Bradyrhizobium japonicum*, *nifU* und *nifB* aus *Klebsiella pneumoniae*). Diese Hybride lassen sich unter anaeroben Bedingungen nicht aktivieren (Tabelle 24). Das bedeutet, daß der für *fdhF* typische Aktivierungsmechanismus mit dem URS-Element von *fdhF* nicht auf jeden beliebigen NTRA-abhängigen Promotor übertragen werden kann. Die Ursache für diesen Befund ist nicht bekannt. Das Problem wirft aber eine interessante Frage auf: Existieren Unterschiede zwischen den

einzelnen -12/-24 Promotoren, die von spezifischen Faktoren erkannt werden und die für die Promotoraktivierung entscheidend sind?

Ein Vergleich der Nukleotidsequenzen im Promotorbereich und im Aminoterminus der kodierenden Regionen von *nifD*, *nifU*, *nifB* einerseits und *fdhF* und *nifH* andererseits ergab keinen eindeutigen Hinweis auf homologe Primärstrukturelemente. Vielleicht sind Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen NTRA-abhängigen Promotoren also nicht in der Primärstruktur, sondern in anderen Eigenschaften, wie zum Beispiel der Topologie der DNA im Promotorbereich zu suchen. Der DNA Topologie wurde in den letzten Jahren eine zunehmende Bedeutung für die Genregulation beigemessen. Für bestimmte anaerob regulierte Gene in *Salmonella typhimurium* (205), für das *tonB*-Gen von *E. coli* und *S. typhimurium* (54), sowie für Gene der Photosynthesekomponenten aus *Rhodobacter capsulatus* (207) konnte beispielsweise gezeigt werden, daß Veränderungen in der übergeordneten Raumstruktur der DNA Helix einen entscheidenden Einfluß auf die Genexpression zur Folge haben. Detaillierte Untersuchungen zu dieser Thematik wurden bislang am *fdhF*-Promotor nicht durchgeführt. Es ist lediglich aus Arbeiten von Axley und Stadtman (8) bekannt, daß die anaerobe Expression des *fdhF*-Gens nach Inhibierung der DNA Gyrase etwas erhöht wird. Für das *nifH*-Gen aus *Klebsiella pneumoniae* konnte dagegen gezeigt werden, daß Hemmstoffe der DNA Gyrase keinen Effekt auf die NIFA-abhängige Aktivierung der Genexpression haben (53). Hingegen können andere Gene mit -12/-24 Promotoren (wie *nifL*) in Zellen ohne funktionelle DNA Gyrase nicht mehr transkribiert werden (51, 53).

Überlegungen zum Mechanismus der *fdhF*-Regulation

Im Laufe dieser Arbeit wurden an einer Reihe von *fdhF*-Varianten im wesentlichen immer drei Phänomene der *fdhF*-Regulation untersucht: die "Formiatinduktion", die "Sauerstoffrepression" und die "Nitratrepression" (anaerob). Diese Formulierung stellt eine Vereinfachung dar, denn die Moleküle Formiat, Nitrat und Sauer-

stoff können kaum die eigentlichen Effektoren der Genregulation sein. Diese Aufgabe wird mit Sicherheit von Proteinkomponenten wahrgenommen, die zum einen intrazelluläres Formiat (oder ein Folgeprodukt von Formiat) und zum anderen Nitrat oder Sauerstoff im Anzuchtmedium sensieren und dementsprechend die Genexpression steuern. In Zusammenhang mit der anaeroben "Formiatinduktion" wurde häufig von einem Aktivierungsmechanismus gesprochen. Diese Aktivierung geschieht nach den hier erarbeiteten Daten wahrscheinlich mit Hilfe eines Regulatorproteins, das das identifizierte URS-Element in der 5' flankierenden Region des fdhF-Gens als Bindestelle erkennen kann. Ein direkter Beweis für diese Theorie konnte noch nicht erbracht werden. Es ist in diesem Zusammenhang aber von Bedeutung, daß alle bekannten NTRA-abhängigen Gene durch Aktivierungsmechanismen kontrolliert werden.

Die genauen Mechanismen, die "Nitrat-" und "Sauerstoffkontrolle" des fdhF-Gens ermöglichen, sind ebenso noch völlig ungeklärt. Eine Reihe von Ergebnissen, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, deuten aber darauf hin, daß es sich dabei um keinen Repressionsmechanismus im herkömmlichen Sinn handeln kann. Folgende Punkte sprechen eindeutig gegen die Existenz von spezifischen Repressoren, die im Promotorbereich oder in der DNA-Region zwischen URS-Element und Promotor binden können und so die Transkription blockieren:

- a) Die fdhF-Transkription wird in Anwesenheit von Sauerstoff oder Nitrat unabhängig von der fdhF-Gendosis blockiert. Das heißt: es kommt zu keiner Titration eines angenommenen Repressors (Tabelle 4).
- b) Es konnten keine Regulationsmutanten mit Mutationen im Promotorbereich isoliert werden, die nicht mehr durch "Sauerstoff" oder "Nitrat" kontrolliert wurden (Tabelle 14).
- c) Die NIFA-abhängige Aktivierung von fdhF'-lacZ findet unter allen Wachstumsbedingungen statt (Tabelle 21).

- d) Die Expression des fdhF(URS)~ nifH Hybrids wird genauso wie die von fdhF in Gegenwart von Sauerstoff oder Nitrat reprimiert. Das bedeutet aber, daß das URS-Element von fdhF auch für die "Sauerstoff"- und "Nitratkontrolle" von fdhF entscheidend ist.

Nach diesen Versuchsergebnissen wurden zwei alternative Modelle entwickelt:

- a) In Gegenwart von Sauerstoff oder Nitrat (anaerob) wird das postulierte Aktivatorprotein, das an das URS-Element binden und die Transkription stimulieren kann, durch unbekannte Faktoren inaktiviert. Dadurch kommt es phänotypisch zu einer Repression der Genexpression.
- b) Es gibt Repressoren in der Zelle, die ebenso wie der postulierte Aktivator an Sequenzen im URS-Element binden und auf diese Weise die Aktivierung der Transkription blockieren.

Die Beobachtung, daß alle untersuchten Veränderungen im URS-Element (Verkürzungen, Punktmutation, Deletionen) grundsätzlich keinen Einfluß auf die "Nitrat"- und "Sauerstoffkontrolle" des fdhF-Promotors haben und lediglich die Promotoraktivierung reduzieren, spricht für die erste der beiden diskutierten Arbeits-hypothesen. Auf jeden Fall sind sicher eine Reihe von trans-Faktoren notwendig, die die komplexe Regulation des fdhF-Gens ermöglichen. Einen ersten Hinweis darauf liefern verschiedene Klassen von Regulationsmutanten, die von V. Schlensog in der letzten Zeit isoliert wurden (168).

Zwei Ergebnisse, die für den Mechanismus der "Sauerstoff"- beziehungsweise "Nitratkontrolle" wichtig sind, sollen hier abschließend noch erwähnt werden.

Das NARL Protein, das für die Nitratinduktion der Nitratreduktase und für die Nitratrepression der Fumaratreduktase (siehe "Einleitung") entscheidend ist (88,97, 188), hat nach Ergebnissen von Stewart und Berg (187) keinen Einfluß auf die fdhF-Regulation.

Die Sensitivität der $fdhF'$ - $'lacZ$ Expression gegenüber dem Chelatkomplexbildner Dipyridyl (Abbildung 21) läßt vermuten, daß eine metallbindende ($FeII$?) Komponente in der Regulation eine Rolle spielt. Unter Umständen handelt es sich dabei sogar um das postulierte Aktivatorprotein. Daß es sich bei dieser Wirkung von Komplexbildnern um keinen unspezifischen Effekt handeln kann, lassen neuere Untersuchungen mit dem pfl -Promotor (für Pyruvat-formiatlyase) vermuten. Dieser ist insensitiv gegenüber Dipyridyl (G. Sawers, persönliche Mitteilung).

Eine Sensitivität gegenüber Chelatkomplexbildnern, wie bei $fdhF$, wurde von Fischer et al. (61) auch für die anaerobe Aktivierung des $nifD$ -Gens durch NIFA in *Bradyrhizobium japonicum* beschrieben. Aufgrund von Untersuchungen mit dem NIFA Protein aus *Bradyrhizobium japonicum* spekulieren diese Autoren, daß die Metallbindende Domäne des Regulatorproteins für die Sensierung von Sauerstoff entscheidend sein könnte. Nach diesem Modell enthält das Regulatorprotein unter anaeroben Bedingungen ein reduziertes Metallion als Cofaktor und wird dadurch in einer aktiven Konformation gehalten.

* * *

ZUSAMMENFASSUNG

Die Regulation der Synthese typischer Gärungsenzyme in *Escherichia coli* ist noch weitgehend ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Problem am Beispiel eines Strukturgens (*fdhF*) der Formiatdehydrogenase H untersucht. Das *fdhF*-Gen kodiert für das 80 kDa Selenopeptid der Formiatdehydrogenase.

Folgende, für die Regulation auf Transkriptionsebene wichtigen Ergebnisse wurden dabei erhalten:

- Die *fdhF*-Transkription ist unabhängig vom Spurenelement Selen.
- Die Translation der *fdhF* mRNA terminiert ohne 0,1 bis 0,2 μM Na_2SeO_3 im Anzuchtmedium am intragenen TGA-(Stopp)-Kodon.
- Die *fdhF*-Transkription ist unabhängig vom *fnr*-Genprodukt.
- Das *fdhF*-Gen hat einen -12/-24 ("nif"-) Konsensuspromotor.
- Eine Erhöhung der *ntrA*-Gendosis hat keinen Einfluß auf die *fdhF* Transkription.
- Das Phänomen der "anaeroben Induktion" der *fdhF*-Expression ist nicht an das *ntrA*-Genprodukt gekoppelt.
- Die *fdhF*-Induktion ist zeitlich betrachtet ein relativ langsamer Prozeß.
- NTRB und NTRC, die Regulatorproteine des NTR-Regulons, haben keinen Einfluß auf die *fdhF*-Regulation.
- In Gegenwart des Chelatkomplexbildners Dipyridyl ist eine Expression von *fdhF'*-*'lacZ* gehemmt.

- Im 5' flankierenden Bereich des fdhF Gens befindet sich an Position -110 (+1: Transkriptionsstart) ein cis-regulatorisches DNA-Element (sogenanntes URS-Element).
- Das identifizierte URS-Element besitzt Eigenschaften, die eukaryontischen "enhancer"-Elementen ähnlich sind.
- Das URS-Element ist entscheidend für alle bekannten Regulationsphänomene, die am fdhF-Gen beobachtet werden.
- Der fdhF-Promotor läßt sich durch das NIFA Protein unter allen Wachstumsbedingungen aktivieren.
- Hybride zwischen NTRA-abhängigen Promotoren und URS-Elementen aus verschiedenen Systemen zeigen, daß mit einem speziellen URS-Element ein spezifischer Aktivierungsmechanismus auf andere Gene übertragen werden kann.
- Das URS-Element von fdhF ist nicht bei jedem beliebigen NTRA-abhängigen Promotor als cis-regulatorisches Element funktionsfähig.

Die entscheidende Schlußfolgerung aus diesen Ergebnissen ist, daß die fdhF-Transkription mit großer Wahrscheinlichkeit über einen positiven Kontrollmechanismus reguliert wird. Die notwendige Identifizierung und Analyse des postulierten Regulatorproteins kann in Zukunft die Aufklärung der exakten Regulationsmechanismen ermöglichen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Aiba, H., Adya, S., de Crombrughe, B. (1981) J. Biol. Chem. 256: 11905-11910.
2. Aliabadi, Z., Warren, F., Mya, S., Foster, J.W. (1986) J. Bacteriol. 165: 780-786.
3. Alvarez-Morales, A., Betancourt-Alvarez, M., Kaluza, K., Hennecke, H. (1986) Nucl. Acids Res. 10: 4207-4227.
4. Alvarez-Morales, A., Hennecke, H. (1985) Mol. Gen. Genet. 199: 306-314.
5. Amann, E., Brosius, J., Ptashne, M. (1983) Gene 25: 167-178.
6. An, G., Friesen, J.D. (1979) J. Bacteriol. 140: 400-407.
7. Ausubel, F. (1984) Cell 37: 5-6.
8. Axley, M., Stadtman, T. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1023-1027.
9. Backman, K., Chen, Y.M., Magasanik, B. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3743-3747.
10. Bagg, A., Neilands, J.B. (1987) Microbiol. Rev. 51: 509-518.
11. Ballantine, S.P., Boxer, D.H. (1986) Eur. J. Biochem. 156: 277-284.
12. Banerji, J., Rusconi, S., Schaffner, W. (1981) Cell 27: 299-308.
13. Barany, F. (1985) Gene 37: 111-123.
14. Barrett, E.L., Jackson, C.E., Fukumoto, H.T., Chang, G.W. (1979) Mol. Gen. Genet. 177: 95-101.
15. Barrett, E.L., Kwan, H.S., Macy, J. (1984) J. Bacteriol. 158: 972-977.
16. Barry, G., Squires, C.L., Squires, C. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4922-4926.
17. Begg, Y.A., Whyte, J.N., Haddock, B.A. (1977) FEMS Microbiol. Lett. 2: 47-50.
18. Belasco, J.G., Beatty, J.T., Adams, C.W., von Gabain, A., Cohen, S.N. (1985) Cell 40: 171-181.
19. Bender, R.A., Janssen, K.A., Resnick, A.D., Blumenberg, M., Foor, F., Magasanik, B. (1977) J. Bacteriol. 129: 1001-1009.

20. Benson, S.A. (1984) *Biotechniques* 2: 66-68.
21. Better, M., Ditta, G. Helinski, D.R. (1985) *EMBO J.* 4: 2419-2424.
22. Beynon, J., Cannon, M., Buchanan-Wollaston, V., Cannon, F. (1983) *Cell* 34: 665-671.
23. Birkmann, A. (1985) Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München.
24. Birkmann, A., Sawers, G., Böck, A. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210: 535-542.
25. Birkmann, A., Zinoni, F., Sawers, G., Böck, A. (1987) *Arch. Microbiol.* 148: 44-51.
26. Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) *Nucl. Acids Res.* 7:1513-1522.
27. Böhm, R. (1987) Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München.
28. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Green, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S. (1977) *Gene* 2: 95-113.
29. Brosius, J., Cate, R.L., Perlmutter, A.P. (1982) *J.Biol.Chem.* 257: 9205-9210.
30. Buchanan-Wollaston, V., Cannon, M.C., Beynon, J.L., Cannon, F. C. (1981) *Nature London* 294: 776-778.
31. Buck, M. (1986) *J. Bacteriol.* 166: 545-551.
32. Buck, M., Miller, S., Drummond, M., Dixon, R. (1986) *Nature London* 320: 374-377.
33. Buck, M., Woodcock, J., Cannon, W., Mitchenall, L., Drummond, M. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210: 140-144.
34. Burton, Z., Burgers, R.R., Lin, J., Moore, D., Holder, S., Gross, C.A. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9: 2889-2903.
35. Cannon, M., Hill, S., Kavanaugh, E., Cannon, F. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 198: 198-206.
36. Casadaban, M.C., Chou, J., Cohen, S.N. (1980) *J. Bacteriol.* 143: 971-980.
37. Casadaban, M.J., Cohen, S.N. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 76: 4530-4533.
38. Castano, I., Bastarrachea, F. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 195: 228-233.
39. Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. (1978) *J.Bacteriol.* 134:1141-1156.
40. Chen, E.Y., Seeburg, P.H. (1985) *DNA* 4: 165-170.

41. Chen, Y.M., Backman, K., Magasanik, B. (1982) *J. Bacteriol.* 150: 214-220.
42. Chippaux, M., Bonnefoy-Orth, V., Ratouchniak, J., Pascal, M. C. (1981) *Mol. Gen. Genet.* 182: 477-479.
43. Clark, D.P. (1984) *FEMS Microbiol. Lett.* 24: 251-254.
44. Clewell, D.B., Helinski, D.R. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62: 1159-1166.
45. Cohen-Bazire, B., Sistrom, W.R., Stanier, R.Y. (1957) *J. Cell. Comp. Physiol.* 49: 25-68.
46. Contreras, A., Drummond, M. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 4025-4039.
47. Cox, J.C., Edwards, E.S., DeMoss, J.A. (1981) *J. Bacteriol.* 145: 1317-1324.
48. Dandanell, G., Valentin-Hansen, P., Larsen, J.E.L., Hammer, K. (1987) *Nature* 325: 823-826.
49. De Boer, H.A., Comstock, L.J., Vasser, M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25.
50. De Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M., Neilands, J.B. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 2624-2630.
51. Dimri, G.P., Das, H.K. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 212: 360-363.
52. Dixon, R. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 203: 129-136.
53. Dixon, R.A., Henderson, N.C., Austin, S. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 9933-9946.
54. Dorman, C., Barr, G., Bhriain, N., Higgins, C. (1988) *J. Bacteriol.* 170: 2816-2826.
55. Dreiseikelmann, B., Eichenlaub, R., Wackernagel, W. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 562: 418-428.
56. Drews, G. (1976) *Mikrobiologisches Praktikum*, Springer Verlag.
57. Dretzen, G., Bellare, M., Sassone-Cossi, P., Chambon, P. (1981) *Anal. Biochem.* 112: 295-298.
58. Emtage, J.S., Tacon, W.C.A., Catlin, G.H., Jenkins, B., Porter, A.G., Carey, N.H. (1980) *Nature* 283: 171-174.
59. Enoch, H.G., Lester, R.L. (1972) *J. Bacteriol.* 110: 1032-1040.
60. Fimmel, A.L., Haddock, B.A. (1979) *J. Bacteriol.* 138: 726-730.
61. Fischer, H.-M., Bruderer, T., Hennecke, H. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 2207-2224.

62. Fraenkel, D.G., Neidhardt, F.C. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 53: 96-100.
63. Fürste, J.P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M., Lanka, E. (1986) *Gene* 48: 119-131.
64. Fuhrmann, M., Hennecke, H. (1984) *J. Bacteriol.* 158:1005-1011.
65. Gaillardin, C.M., Magasanik, B. (1978) *J. Bacteriol.* 133: 1329-1338.
66. Garcia, E., Baucroft, S., Rhee, S.G., Kustu, S. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 1662-1666.
67. Gitt, M.A., Wang, L.-F., Doi, R.H. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 7178-7185.
68. Gray, C.P., Sommer, R., Polke, C., Beck, E., Schaller, H. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 50-53.
69. Gray, C.T., Gest, H. (1965) *Science* 148: 186-192.
70. Griffiths, L., Cole, J.A. (1987) *Arch. Microbiol.* 147: 364-369.
71. Gubler, M. (1989) *Molec. Microbiol.* 3: 149-159.
72. Gupta, R.S., Schlessinger, D. (1976) *J. Bacteriol.* 125: 84-93.
73. Gussin, G.N., Ronson, C.W., Ausubel, F.M. (1986) *Ann. Rev. Genet.* 20: 567-591.
74. Haddock, B.A., Mandrand-Berthelot, M.A. (1982) *Biochem. Soc. Trans.* 10: 478-480.
75. Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
76. Hantke, K. (1981) *Mol. Gen. Genet.* 182: 288-292.
77. Hantke, K. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 197: 337-341.
78. Hantke, K. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210: 135-139.
79. Hantke, K. (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 53-57.
80. Harley, C.B., Reynolds, R.P. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15:2343-2361.
81. Hiraga, S., Yanofsky, Ch. (1972) *J. Mol. Biol.* 72: 103-110.
82. Hirschman, J., Wong, P.K., Sei, K., Keener, J., Kustu, S. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7525-7529.
83. Holm, B., Collins, J. (1980) *Gene* 11: 291-298.
84. Hui, A., Hayflick, J., Dinkelspiel, K., de Boer, H.A. (1984) *EMBO J.* 3: 623-629.
85. Hunt, T.P., Magasanik, B. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8453-8457.

86. Ihara, M., Oda, Y., Yamamoto, K. (1985) FEMS Microbiol.Lett. 30: 33-35.
87. Iuchi, S., Lin, E.C.C. (1987) J. Bacteriol. 169: 3720-3725.
88. Iuchi, S., Lin, E.C.C. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3901-3905.
89. Iuchi, S., Lin, E.C.C. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1888-1892.
90. Jacob, W.F., Santer, M., Dahlberg, A.E. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4757-4761.
91. Jamieson, D.J., Higgins, C.F. (1986) J. Bacteriol. 168: 389-397.
92. Jamieson, D.J., Sawers, R.G., Rugman, P.A., Boxer, D.H., Higgins, C.F. (1986) J. Bacteriol. 168: 405-411.
93. Johnson, D.A., Gautsch, J.W., Sportsman, J.R., Edler, J.H. (1984) Gene Anal. Technol. 1: 3-8.
94. Johnson, E.A., Levine, R.L., Lin, E.C.C. (1985) J.Bacteriol. 164: 479-483.
95. Jones, H.M., Gunsalus, R.P. (1985) J. Bacteriol. 164: 1100-1109.
96. Jones, H.M., Gunsalus, R.P. (1987) J. Bacteriol. 169: 3340-3349.
97. Kalman, L.V., Gunsalus, R.P. (1988) J. Bacteriol. 170: 623-629.
98. Kaluza, K., Hennecke, H. (1981) Arch. Microbiol. 130: 38-43.
99. Kelley, P.M., Freeling, M. (1984) J. Biol. Chem. 259: 14180-14183.
100. Klotsky, R.A., Schwartz, I. (1987) Gene 55: 141-146.
101. Knappe, J., Blaschkowski, H.P. (1975) Methods in Enzymol. 41: 508-518.
102. Knappe, J., Neugebauer, F.A., Blaschkowski, H.P., Gänzler, M. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1332-1335.
103. Knappe, J., Schacht, J., Möckel, W., Höpner, Th., Vetter, H., Edenharder, R. (1969) Eur. J. Biochem. 11: 316-327.
104. Kuritzkes, D.R., Zhang, X.-Y., Lin, E.C.C. (1984) J.Bacteriol. 157: 591-598.
105. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227: 680-685.
106. Lambden, P.R., Guest, J.R. (1976) J. Gen. Microbiol. 97: 145-160.

107. Lamond, A.J., Travers, A.A. (1983) *Nature* 305: 248-250.
108. Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., Boedtker, H. (1977) *Biochemistry* 16: 4743-4751.
109. Leinfelder, W., Forchhammer, K., Zinoni, F., Sawers, G., Mandrand-Berthelot, M.A., Böck, A. (1988) *J. Bacteriol.* 170: 540-546.
110. Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M.-A., Böck, A. (1988) *Nature* 331: 723-725. CP
111. Lester, R.L., DeMoss, J.A. (1971) *J. Bacteriol.* 105: 1006-1014.
112. Li, S., DeMoss, J.A. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 4614-4620.
113. Li, S., DeMoss, J.A. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 13700-13705.
114. Li, S., Rabi, T., DeMoss, J.A. (1985) *J. Bacteriol.* 164: 25-32.
115. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
116. Lupski, J.R., Ruiz, A.A., Godson, G.N. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 195: 391-401.
117. Lyons, L.B., Zinder, N.D. (1972) *Virology* 49: 45-60.
118. Maas, W.K., Clark, A.J. (1964) *J. Mol. Biol.* 8: 365-370.
119. MacNeil, T., MacNeil, D., Tyler, B. (1982) *J. Bacteriol.* 150: 1302-1313.
120. MacNeil, T., Roberts, G.P., MacNeil, D., Tyler, B. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 188: 325-333.
121. Maloy, S.R., Nunn, W.D. (1981) *J. Bacteriol.* 145: 1110-1112.
122. Mandrand-Berthelot, M.A., Wee, M.Y.K., Haddock, B.A. (1978) *FEMS Microbiol. Lett.* 4: 37-40.
123. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
124. Maxam, A.M., Gilbert, W. (1980) *Methods in Enzymology* 65: 499-560.
125. Merrick, M.J. (1983) *EMBO J.* 2: 39-44.
126. Merrick, M.J., Gibbins, J.R. (1985) *Nucl. Acids Res.* 13: 7607-7620.
127. Merrick, M.J., Gibbins, J.R., Postgate, J.R. (1987) *J. Gen. Microbiol.* 133: 2053-2057.

128. Merrick, M., Gibbins, J., Toukdarian, A. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210: 323-330.
129. Merrick, M.J., Stewart, W.D.P. (1985) *Gene* 35: 297-303.
130. Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
131. Minton, N.B., Clarke, L.E. (1985) *J. Mol. Appl. Genet.* 2: 26-35.
132. Neumüller, O.-A. (1979) *Römpps Chemie-Lexikon*, Franckh'sche Verlagshandlung Stuttgart.
133. New England Nuclear Katalog; NEF-972: 6-7.
134. Newman, M., Cole, J.A. (1978) *J. Gen. Microbiol.* 106: 1-12.
135. Ninfa, A.J., Magasanik, B. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5909-5913.
136. Norioka, S., Ramakrishnan, G., Ikenaka, K., Inouye, M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 17113-17119.
137. Norrander, J., Kempe, T., Messing, J. (1983) *Gene* 26: 101-106.
138. Ow, D.W., Ausubel, F.M. (1983) *Nature* 301: 307-313.
139. Ow, D.W., Xiong, Y., Gu, Q., Shen, S.C. (1985) *J. Bacteriol.* 161: 868-874.
140. Pascal, M.C., Burini, J.F., Chippaux, M. (1984) *Mol. Gen. Genet.* 195: 351-355.
141. Pavaglio, M.T., Tang, J.S., Unger, R.E., Barrett, E.L. (1988) *J. Bacteriol.* 170: 213-217.
142. Pecher, A., Zinoni, F., Böck, A. (1985) *Arch. Microbiol.* 141: 359-363.
143. Pecher, A., Zinoni, F., Jatisatienr, C., Wirth, R., Hennecke, H., Böck, A. (1983) *Arch. Microbiol.* 136: 131-136.
144. Peck, H.D., Gest, H. (1957) *J. Bacteriol.* 73: 706-721.
145. Pelham, H. (1985) *Trends Genetic* 1: 6.
146. Pinsent, J. (1954) *Biochem. J.* 57: 10-16.
147. Prentki, P., Krisch, H.M. (1984) *Gene* 29: 303-313.
148. Ptashne, M. (1986) *Nature* 322: 697-701.
149. Reitzer, L.J., Bueno, R., Cheng, W.D., Abrams, S.A., Rothstein, D.M., Hunt, T.P., Tyler, B., Magasanik, B. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 4279-4284.
150. Reitzer, L.J., Magasanik, B. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1979-1983.

151. Reitzer, L.J., Magasanik, B. (1986) *Cell* 45: 785-792.
152. Ronson, C.W., Astwood, P.M. (1985) in: *Nitrogen fixation research progress*. Evans, H.J., Bottomley, P.I., Newton, W. E.; Martinus Nijhoff, Dordrecht, S. 165-171.
153. Ronson, C.W., Nixon, B.T., Albright, L.M., Ausubel, F.M. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 2424-2431.
154. Rosenberg, M., Court, D. (1979) *Ann. Rev. Genet.* 13:319-353.
155. Ross, G.W., O'Callaghan, C.H. (1974) in: *Methods in Enzymology* 43: 69-85.
156. Rothstein, D.M., Pahel, G., Tyler, B., Magasanik, B. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7372-7376.
157. Ruch, F.E., Kuritzkes, D.R., Lin, E.C.C. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 1365-1370.
158. Ruch, F.E., Lin, E.C.C., Kowit, J.D., Tang, C.-T., Goldberg, A.L. (1980) *J. Bacteriol.* 141: 1077-1085.
159. Sachs, M.M., Freeling, M. (1978) *Mol. Gen. Genet.* 161: 111-115.
160. Sachs, M.M., Freeling, M., Okimoto, R. (1980) *Cell* 20: 761-767.
161. Sankar, P., Shanmugam, K.T. (1988) *J. Bacteriol.* 170: 5433-5439.
162. Sawers, R.G., Ballantine, S.P., Boxer, D.H. (1985) *J. Bacteriol.* 164: 1324-1331.
163. Sawers, R.G., Böck, A. (1988) *J. Bacteriol.* 170: 5330-5336.
164. Sawers, R.G., Böck, A. (1989) *J. Bacteriol.* (im Druck).
165. Sawers, R.G., Boxer, D.H. (1986) *Eur. J. Biochem.* 156: 265-275.
166. Sawers, R.G., Zehelein, E., Böck, A. (1988) *Arch. Microbiol.* 149: 240-244.
167. Schlegel, H.G., Vollbrecht, D. (1980) *J. Gen. Microbiol.* 117: 475-481.
168. Schlensog, V. (1988) *Diplomarbeit, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München.*
169. Schmitz, G., Nikaido, K., Ames, G. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 215: 107-117.
170. Schneider, E., Blundell, M., Kennell, D. (1978) *Mol. Gen. Genet.* 160: 121-129.

171. Schwartz, M., Roa, M., Debarbouille, M. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2937-2941.
172. Shapiro, B.N., Stadtman, E.R. (1970) in: *Methods in Enzymology* 17A: 910-922.
173. Shaw, D.J., Guest, J.R. (1981) *Mol. Gen. Genet.* 181: 95-100.
174. Shaw, D.J., Guest, J.R. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10: 6119-6130.
175. Shaw, D.J., Rice, D.W., Guest, J.R. (1983) *J. Mol. Biol.* 166: 241-247.
176. Shine, J., Dalgarno, L. (1975) *Nature* 254: 34-38.
177. Scott, K.E., Rolfe, B.G., Shine, J. (1981) *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 71-81.
178. Smith, M.W., Neidhardt, F.C. (1983) *J. Bacteriol.* 154: 336-343.
179. Smith, R.G., Halpern, Y.S., Magasanik, B. (1971) *J. Biol. Chem.* 246: 3320-3329.
180. Sollner-Webb, B., Reeder, R.H. (1979) *Cell* 18: 485-499.
181. Spiro, S., Guest, J.R. (1987) *J. Gen. Microbiol.* 133: 3279-3288.
182. Spiro, S., Guest, J.R. (1987) *Mol. Microbiol.* 1: 53-58.
183. Spiro, S., Guest, J.R. (1988) *Mol. Microbiol.* 2: 701-707.
184. Steinbüchel, A., Kuhn, M., Niedrig, M., Schlegel, H.G. (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129: 2825-2835.
185. Stewart, V. (1982) *J. Bacteriol.* 151: 1320-1325.
186. Stewart, V. (1988) *Microbiol. Rev.* 52: 190-232.
187. Stewart, V., Berg, B. (1988) *J. Bacteriol.* 170: 4437-4444.
188. Stewart, V., Parales, J. (1988) *J. Bacteriol.* 170: 1589-1597.
189. Strauch, K.L., Lenk, J.B., Gamble, B.L., Miller, Ch.G. (1985) *J. Bacteriol.* 161: 673-680.
190. Streber, W.R., Timmis, K.N., Zenk, M.H. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 2950-2955.
191. Stüber, D., Bujard, H. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 167-171.
192. Tabor, S., Richardson, C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1074-1078.
193. Tommassen, J., Koster, M., Overduin, P. (1987) *J. Mol. Biol.* 198: 633-641.
194. Uden, G., Duchene, A. (1987) *Arch. Microbiol.* 147: 195-200.

195. Unden, G., Guest, J.R. (1985) *Eur. J. Biochem.* 146: 193-199.
196. Waugh, R., Boxer, D.H. (1986) *Biochimie* 68: 157-166.
197. Weaver, F.R., Weissmann, C.H. (1979) *Nucl. Acids Res.* 7: 1175-1193.
198. Wich, G., Hummel, H., Jarsch, M., Bär, U., Böck, A. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 2459-2479.
199. Wimpenny, J.W.T., Cole, J.A. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 148: 233-242.
200. Wimpenny, J.W.T., Firth, A. (1972) *J. Bacteriol.* 111: 24-32.
201. Winkelman, J.W., Clark, D.P. (1986) *J. Bacteriol.* 167: 362-367.
202. Wong, P.-K., Popham, D., Keener, J., Kustu, S. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 2876-2880.
203. Wu, L.F., Mandrand-Berthelot, M.-A. (1986) *Biochimie* 68: 167-179.
204. Wu, L.F., Mandrand-Berthelot, M.-A. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 209: 129-134.
205. Yamamoto, N., Droffner, M.L. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2077-2081.
206. Zagorec, M., Buhler, J.-M., Treich, I., Keng, T., Guarente, L., Labbe-Bois, R. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 9718-9724.
207. Zhu, Y., Hearst, J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4209-4213.
208. Zinoni, F. (1987) *Dissertation, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München.*
209. Zinoni, F., Beier, A., Pecher, A., Wirth, R., Böck, A. (1984) *Arch. Microbiol.* 139: 299-304.
210. Zinoni, F., Birkmann, A., Stadtman, T.C., Böck, A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4650-4654.
211. Zinoni, F., Birkmann, A., Leinfelder, W., Böck, A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3156-3160.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Böck, unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde, für seine Unterstützung, seine wissenschaftliche Förderung und seine Freude an intensiver Diskussion in allen Abschnitten dieser Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön auch an Herrn Prof. Dr. H. Hennecke, der vor allem den letzten Teil dieser Arbeit entscheidend mitgeprägt hat.

Allen meinen Kollegen im Institut, besonders F. Zinoni und G. Sawers, möchte ich für ihr Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für ihre Bereitschaft zu intensiver Diskussion danken.

W. Leinfelder danke ich insbesondere für die Überlassung der Cosmidbank, ohne die eine Klonierung des ntrA Gens aus E. coli so rasch nicht möglich gewesen wäre.

Bei Herrn Dr. P. Buckel und Herrn Dr. R. Mertz möchte ich mich für die Synthese von Oligonukleotiden, bei Herrn Dr. M. Buck für die Überlassung der Plasmide pSMM4, pSMM9 und pSMM161 bedanken.

Eva Laußermair, Verena Schlensog, Christian Baron und Sylvia Hopper, die mir als Studenten bei vielen β -Galaktosidase Tests geholfen haben, gilt auch ein herzliches Dankeschön für die nette und gute Zusammenarbeit.

An letzter, aber keinesfalls an unbedeutender Stelle möchte ich mich bei Frau M. Geier bedanken. Sie hat durch ihre Geduld bei der Reinschrift dieser Arbeit eine Fertigstellung in der vorliegenden Form erst ermöglicht.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten: Angelika Birkmann
geb. am 9. September 1959 in München
Eltern: Walter Birkmann und Ingeborg
Birkmann, geb. Sander

Schulbildung: 1965 - 1969 Grundschule in München
(Ichoschule)
1969 - 1970 Hauptschule in München
(Ichoschule)
1970 - 1979 Theodolinden-Gymnasium
in München
1979 Abitur

Studium: 1979 - 1984 Universität München
Studienfach: Diplom-Biologie
1984 Diplomhauptprüfung

Diplomarbeit: 1984 - 1985 am Lehrstuhl für Mikrobiologie
der Universität München unter
Leitung von Prof. Dr. A. Böck
1985 Diplom

Dissertation: 1985 - 1989 Bearbeitung der vorliegenden
Dissertation am Lehrstuhl für
Mikrobiologie der Universität
München unter Leitung von
Prof. Dr. A. Böck

